

**Е Л А Б О Р А Т**  
**ЗА НАУЧНОИСТРАЖУВАЧКИ ПРОЕКТ**

<b>ШИФРА НА ПРОЕКТОТ:</b>	<b>17-2377-06</b> Меѓународен со Р. Бугарија
<b>НАСЛОВ НА ПРОЕКТОТ:</b>	<b>ДОБИВАЊЕ НА ХАПЛОИДИ ВО КУЛТУРА НА АНТЕРИ ОД ПИПЕРКА (<i>Capsicum annuum</i> L.) И НИВНО ВКЛУЧУВАЊЕ ВО ПРОЦЕСОТ НА СЕЛЕКЦИЈА</b>
<b>ГЛАВЕН ИСТРАЖУВАЧ:</b>	<b>Проф. д-р Лилјана Колева-Гудева</b>
<b>ИНСТИТУЦИЈА:</b>	<b>Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев” - Штип</b>
<b>ТРАЕЊЕ НА ПРОЕКТОТ:</b>	<b>од 01.07. 2006 год. до 30.06.2008 год.</b>
<b>БРОЈ НА ДОГОВОР:</b>	<b>17-2377/1 од 20.09. 2006 год.</b>
<b>ИЗВЕШТАЈНА ГОДИНА:</b>	<b>2008 год. (трета завршна)</b>
<b>ДАТУМ НА ПОДЕНСУВАЊЕ НА ЕЛАБОРАТОТ:</b>	<b>Декември 2008 год.</b>

## СОДРЖИНА

<b>КРАТЕНКИ.....</b>	<b>3</b>
<b>КРАТКА СОДРЖИНА НА ПРОЕКТОТ.....</b>	<b>4</b>
На македонски јазик .....	4
На англиски јазик.....	5
<b>КЛУЧНИ ЗБОРОВИ.....</b>	<b>6</b>
На македонски јазик .....	6
На англиски јазик.....	6
<b>1. ВОВЕД.....</b>	<b>7</b>
1.1. Цели на истражувањето.....	8
<b>2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА.....</b>	<b>9</b>
<b>3. МАТЕРИЛАЈ И МЕТОДИ НА РАБОТА.....</b>	<b>11</b>
3.1. Стерилизација на пупки од <i>C. annuum</i> L. и изолирање на антери.....	11
3.2. Одредување на стадиумот на микроспорите .....	12
3.3. Состав на подлогите за култивирање на антерите.....	12
3.4. Услови за одгледување на културите.....	15
3.5. Поставување на експериментот во лабораториски услови.....	15
3.6. Одредување на кариотип во митотскиот циклус на пиперката ....	17
3.7. Поставување на експериментот на терен (оранжерија и пластеник).....	18
3.8. Статистичка обработка на податоци.....	19
<b>4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>19</b>
4.1. Резултати од лабораториски истражувања.....	19
4.2. Потекло на почетниот материја за селекција.....	22
4.3. Резултати од теренски истражувања (пластеник и оранжерија)....	22
<b>5. ЗАКЛУЧОЦИ.....</b>	<b>39</b>
5.1. На македонски јазик .....	39
5.2. На англиски јазик .....	40
<b>6. ПУБЛИКАЦИИ КОИ ПРОИЗЛЕГУВААТ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО.....</b>	<b>41</b>
<b>7. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>43</b>
<b>8. ПРИЛОГ автентични фотографии од истражувањето.....</b>	<b>47</b>

## **КРАТЕНКИ**

<b>BA</b>	N <sup>6</sup> - бензиладенин
<b>BAP</b>	N <sup>6</sup> - бензиламинопурин
<b>2iP</b>	N <sup>6</sup> - 2 - изопентил аденин
<b>2,4-D</b>	2,4 – дихлорфенокси оцетна киселина
<b>GA<sub>3</sub></b>	гиберелинска киселина
<b>IAA</b>	индолил-3-оцетна киселина
<b>IBA</b>	индолил-3-бутерна киселина
<b>KIN</b>	кинетин, 6-фурфурил amino пурин
<b>NAA</b>	1-нафтален-оцетна киселина
<b>MS медиум</b>	Murashige и Skoog, 1962
<b>LS медиум</b>	Linsmaer и Skoog, 1965
<b>NN медиум</b>	Nitch и Nitch, 1969
<b>N медиум</b>	Nitch, 1969
<b>CP медиум</b>	Dumas de Valux et al., 1981
<b>R<sub>1</sub> медиум</b>	Dumas de Valux et al., 1981
<b>R<sub>2</sub> медиум</b>	Dumas de Valux et al., 1981
<b>V<sub>3</sub> медиум</b>	Dumas de Valux et al., 1981
<b>SPSS</b>	Statistical Package for Social Science - Компјутерска програма за статистичка обработка на податоци
<b>±S.D.</b>	стандардна девијација
<b>p</b>	праг на сигнификантност

## КРАТКА СОДРЖИНА НА ПРОЕКТОТ

### а) на македонски јазик

Пиперката е една од најраспространетите зеленчукови култури во повеќето земји во светот. Овој факт е резултат на високата биолошка вредност на плодовите (висока содржина на сува материја, поливитамини, минерални материји, есенцијални масла), и резултат на можноста да се користи како храна во свежа состојба или во форма на технолошки преработена храна. Постојната специфична генетичка разновидност на локални форми и стари вариетети кои се типични и добро адаптирани на овој регион, е и извонредно голема и се користи за подобрување на некои карактеристики кои се од интерес за утврдување на комерцијални вариетети (сорти) и F1 хибриди.

Создавањето на сорти на пиперка, кои одговараат на модерните потреби, е долготраен и макотрпен процес што резултира од брзата генетска дегенерација на материјалот за одгледување како резултат на неконтролирана страна полинација, потреба за примена на одредени шеми за одржување со изолација со големо пространство и недостаток од можноста за вегетативна репродукција. Овие потешкотии во конвенционалниот процес на одгледување можат да се надминат преку воспоставување и вовед на прецизни и соодветни методи за *in vitro* производство на хаплоидни регенеранти од микроспорно потекло од антерна култура и диплоидизација на геном. Хаплоидните растенија се идеален материјал за генетско и селекционерско проучување поради вкупното изразување на генетската потенцијал и мутации, од кои дел остануваат невидливи во рецесивна форма во диплоидните организми. Хаплоидните растенија се извонредно вредни во хетерозичната селекција. Со мултипликција на нивниот хромозомски се добиени голем број изогенетски линии, чие создавање во традиционалната селекција пара еден долг временски период, придружен со внатре-селекција и бек-крос оплодување, со контролирано само-опрашување и селекција на одделни индивидуални растенија. Забрзаното добивање на стабилни хомозиготни линии е предност кое е возможно само со хаплоидната селекција и тешко може да се постигне со други методи на селекција.

Хаплоидите ги зголемуваат можностите за користење на целиот спектар на генетската разновидност преку брза генотипска селекција на квалитативни и квантитативни карактеристики. Според некои автори, хаплоидноста изразува значајни предности во случаите кога материјалите се со голем степен на хетерозиготност и кога голем број гени се пренесени во со процесот на хибридизација. Такви линии, во зависност од целите на селекцијата и изразените карактеристики, можат да бидат користени за директни воведи, исто како и родителски компоненти во селекцијата на хибридни вариетети (сорти). Присуството на единечен број на хромозоми во хаплоидниот кариотип подржува исто така и селекција на мутантни форми, добиени под влијание на физички или хемиски мутагенетски фактори или спонтано во процесот на *in vitro* култивацијата

- гаметоклонска варијабилност. Сите горе-наведени факти ги мотивираат нашите интереси за добивање на хаплоиди и можностите тие да бидат користени за создавање и стабилизација на генетска разновидност кај оваа за земјата значајна земјоделска култура - пиперката.

Овој проект беше назначен за оптимизирање на условите за индукција на ембриогенезата во култури на антери од повеќе различни генотипови на пиперка. Со цел да се зголеми ефективността на методот и да се развие целосна технологија за добивање на хаплоидни и диплоидни растенија - регенеранти кои ќе бидат цитолошки и морфолошки карактеризирани и вклучени во студиите за селекција за добивање на нови сорти на пиперка или стабилизација на хомозиготни линии за создавање на F1 хибриди, кои одговараат на новите тенденции во селекцијата (одгледувањето) на пиперка.

Потточките на овој предлог - проект вклучуваат:

- Ефективна технологија за добивање на хаплоидни и диплоидни растенија - регенеранти по начинот на *in vitro* ембриогенеза во култура на антера од пиперка, микропропагација и адаптација во *in vitro* услови и развој на значајни изогенетски линии за селективниот процес;
- Карактеризација и агрономска евалуација на добиените андрогентски линии во оранжериски и пластенички услови;
- Споредба на значајни изогенетски линии за селективни цели во процесот на хибридизација.

## **б) на англиски јазик**

Pepper is one of the most widely spread vegetable crops in most of the countries in the world. This fact is due to the high biological value of its fruits /high content of dry substance, polivitamins, mineral substances, essential oils/, and due the possibility to be used as food in fresh state or under the form of technological processed products. The existing specific genetic diversity of local forms and old varieties that are typical and well adapted to this region, is exclusively large and is used for improvement of some characteristics that are of interest for the establishment of trade varieties and F1 hybrids. The creation of varieties of pepper, corresponding to the modern requirements, is a long-term and labor-consuming process due to the fast genetic degeneration of breeding materials as a result of uncontrolled foreign pollination, necessity of applying certain schemes of maintenance with large space isolations and lack of possibility for vegetative reproduction. These difficulties in the conventional breeding process may be overcome through the establishment and introduction of precise and optimized methods for *in vitro* production of haploid regenerants of microspore origin from anther culture and genome diploidization. The haploid plants are the ideal material for genetic and breeding studies because of the total manifestation of genetic potency and mutations, part of which remain invisible in recessive state of diploid organisms. The haploid plants are extremely valuable at the heterosis breeding. By the multiplication of their chromosome number highly isogenic lines are received, the creation of which at the

traditional breeding requires a long period of time, accompanied by inbreeding and back-cross fertilization, by controlled self-pollination and breeding of separate individual plants. The accelerated obtaining of stable homozygous lines is an advantage; posses only by the haploid breeding and it can be hardly achieved at the other methods of breeding.

The haploids increase the possibilities for usage of the whole spectrum of genetic diversity through fast genotype breeding of qualitative and quantitative characteristics. According to some authors, the haploid manifests considerable advantages in the cases when the materials are with high degree of heterozigosity and when a great number of genes are transferred in the process of hybridization. Such lines, depending on the breeding goals and the manifested characteristics, might be used for direct introductions, as well as like parents components in the breeding of hybrid varieties. The presence of a single number of chromosomes in the haploid caryotype facilitates also the breeding of mutant forms, obtained under the influence of physical and chemical mutagenic factors or spontaneously in the process of *in vitro* cultivation – gametoclinal variability. The above-stated facts motivate our interest in obtaining haploids and the possibilities they to be used for the creation and stabilization of genetic diversity in this significant for the country agricultural crop – the pepper.

The current project is aimed at optimizing the conditions for induction of embryogenesis in anther cultures of different pepper genotypes, in order to increase the method's effectiveness to development of a complete technology for obtaining of haploid and dihaploid plant–regenerants, which will be cytologically and morphologically characterized and included in the breeding studies for obtaining of new pepper varieties or stabilization of homozygous lines for creation of F1 hybrids, corresponding to the new tendencies in pepper breeding.

The deliverables of the proposed project include:

- Effective technology for obtaining of haploid and dihaploid plant-regenerants by the way of *in vitro* embryogenesis in anther culture of pepper, micropropagation and adaptation to *in vivo* conditions for developing of valuable for the breeding process izogenic lines;
- Charakterization and evaluation of androgenetic lines of pepper grown in glasshouse and plastic tunel conditions;
- Comprising of valuable for the breeding purposes izogenic lines in the process of hybridization.

## КЛУЧНИ ЗБОРОВИ

### На македонски јазик:

Пиперка, Андрогенеза, *in vitro*, Хаплоиди, Дихаплоиди, Карактеризација на андрогенетски линии, Евалуација андрогенетски линии, Пластеник, Оранжерија

### На англиски јазик:

Pepper, Androgenesis, *in vitro*, Haploids, Dihaploids, Characterization of androgenetic lines, Evaluation of androgenetic lines, Plastic tunel, Glasshouse

## 1. ВОВЕД

Андрогенезата, која се одвива во услови *in vitro*, е најнов и најсигурен метод за добивање на хаплоидни единки, каде вегетативното или генеративното јадро од поленовото зрно се стимулира да се развие во хаплоидна индивидуа, без понатамошно оплодување.

И покрај тоа што андрогенезата е возможна од многу видови на земјоделски култури и дрвја, способноста на секој вид за успешна пропација на микроспорите, често е ограничена на само еден генотип или вариетет. Всушност, причината за оваа рестриктивна појава сè уште е непозната, и за жал успешните генотипови често пати немаат комерцијално значење.

Хаплоиди, со изолирање и поставување на антери во услови *in vitro*, може да се добијат на два начини и тоа директно и индиректно (Pierik, 1998):

- Директно кога ембриоиди се формираат директно од поленовото зрно (микроспората);

- Индиректно кога прво се развива калус од поленовите зрна т.е. микроспорите, потоа се формираат ембриоиди или адвентивни изданоци, а на крај регенеранти. Овој тип на развој обично не е поволен бидејќи калусот како стартен материјал има хетерогенетска природа (хаплоиди и диплоиди), и од него можат да се јават спонтани промени од хаплоиди во диплоиди, па дури и во полиплоиди.

Кај пиперката (*Capsicum annuum* L.) единствен тип на експлантати, кои формираат соматски ембриоиди се антери, незрели зиготски ембриоиди и калус добиен од незрели зиготски ембриоиди.

Досегашните работи на полето на култура на растителни клетки и ткива во услови *in vitro*, како нов биотехнички метод во нашата држава, се ограничени. Во Република Македонија на проблематиката за култура на пиперка во услови *in vitro* кај сортата куртовска капија, од котиледони, хипокотили, апикални пупки и антери имаат работено само Колева и Спасеноски (1995, 1996, 2001).

Што се однесува до андрогенезата на пиперка, во нашата држава истражувањата од ваков тип се скромни, а токму тоа е и предизвик за работа на оваа проблематика.

Очигледно е дека одгледувачите и генетичарите имаат голем број потешкотии во добивањето на хаплоидни растенија. Бројот на растителните видови кај кои хаплоиди спонтано се добиваат *in vivo* е само нешто повеќе од 100, но ова како правило во природата е сосема ретко. Затоа начините за добивање на хаплоидни единки е во методите на спонтанна индукција со различни третмани како: хемиски третмани (со колхицин, пара-флуор-фенилаланин, хлор-амфеникол и др); шокантни високи и ниски температури; осветлување со UV или X зраци и други методи на спонтанна индукција.

George и Narayanaswamy (1973) ја добиле првата експериментална андрогенеза со култура на антери, кои содржеле зрели поленови зрна. Првата успешна андрогенеза на пиперка е добиена во 1981 година од Dumas de Valux. Имено, со култура од антери авторот добива хаплоидни и диплоидни хибриди на

пиперка, и тоа кај различни вариетети. Воедно, испитувана е и стимулацијата на андрогенезата со температурен третман, како и со различна концентрација и комбинација на повеќе фитохормони.

На принцип на методот од Dumas de Valux, авторите Mytiko и Fary (1997), како и Dolcet-Sanjuan и сор. (1997) добиле хаплоидна пиперка од неколку различни сорти.

### 1.1. Цели на истражувањето

Во текот на реализацијата на проектот како специфични цели беа: да се постигне ефективна *in vitro* технологија за проучување на хаплоидни и дихаплоидни растенија-регенеранти; да се индуцира соматска ембриогенеза во култура на антери од пиперка *in vitro*; да се следи развојот на соматските ембрионите во регенеранти; успешно да се адаптираат и аклиматизираат добиените регенеранти од стерилни на оранжериски услови; да се испита регенеративниот потенцијал на *Capsicum annuum* L. во *in vitro* услови, особено способноста за андрогенеза, како и да се испита влијанието на различниот хормонален состав на хранливиот медиум и индуцираниот стрес-третман врз андрогенетскиот потенцијал во култура на антери од различни генотипови на пиперка.

Воедно, предмет на истражувањата беше и да се прошират знаењата за андрогенезата, да се испита морфогенезата и улогата на растителните регулатори на растот, особено на ауксините и цитокинините, врз процесот на соматска ембриогенеза во услови *in vitro*. Испитувањата се изведени со дваесет и еден (21) различни генотипови на пиперка, кои се разликуваат по потеклото на производство и по лутина.

Во текот на тригодишните истражувањата за одредување на можноста за андрогенеза и органогенеза, како и за влијанието на капсаицинонот како инхибиторен фактор врз андрогенетскиот потенцијал, беа поставени и во целост реализирани следните задачи:

- испитување и определување на оптимални услови за успешна стерилизација на цветни пупки од пиперка;
- изолирање на антери, кои содржат микроспори во стадиум на прва поленова митоза, од стерилизирани млади цветни пупки на пиперка;
- поставување на култура на антери од 21 различни генотипови на пиперка во *in vitro* услови;
- проучување на влијанието на составот на хранливата подлога и растителните регулатори врз степенот на андрогенезата кај пиперка;
- одредување на андрогенетскиот потенцијал и способноста за формирање на соматски ембриониди за секоја генотип;
- индукција на калусогенеза од антери;
- индукција на ембриогенеза и формирање на хаплоидни ембриониди кај испитуваните генотипови на пиперка;



- проучување на развојот и адаптацијата на добиените хаплоидни ембриони во млади изданоци во култура;
- аклиматизација на регенерираните растенија од стерилни на асептички услови т.е. прво во клима комора а потоа во оранжериски услови;
- испитување на влијанието на капсаицинот како можеен инхибиторен фактор во процесот на андрогенезата во *in vitro* услови;
- колекционирање на семенски материјал добиен од растенијата регенерирани од култура на антери на пиперка;
- одредување на кариотипот на контролни растенија и на 4 различни сорти од андрогенетски регенерирани;
- добивање на андрогентски селекциони линии на пиперка;
- вклучување на добиените линии во процесот на селекција;
- следење на карактеризационите особини на линиите и во оранжериски услови и во пластеник.

Сите горенаведени цели беа комплетно реализирани, а во целосната имплементација на проектот завршени се сите етапи на истражување кои беа содржани во предлог – проектот.

## 2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

Најраните истражувања за соматската ембриогенеза на пиперка (*Capsicum annuum* L.) се на полето на андрогенезата со култура на антери и тоа: 1973, Kuo, Wang, Chein, Ku, Kung и Hsu; 1973, George и Narayanaswamy; 1977, Saccardo и Devreux; 1979, 1980, Sibi, Dumas de Valux и Chambonet; 1981, Dumas de Valux, Chambonet и Porchard; 1989, Munyon, Hubstenberger и Phillips; 1992, Matsabura et al.; 1992, Park et al.; 1993 Qin и Rotino, но добиентите регенеранти главно биле мешавиба од хаплоидни и дихаплоидни растенија (Kararakis, 1999). Користени се различни стрес третмани со цел да се зголеми соматската ембриогенеза, од една страна, и да се зголеми продукцијата на хаплоиди, од друга страна (Mityko et al., 1995; Rodeva et al., 2004; Okum and Tripirdamaz, 2002; Koleva-Gudeva, 2003; Ashok Kumar et al., 2003; Irikova and Rodeva, 2004).

George и Narayanaswamy (1973) ја добиле првата експериментална андрогенеза со култура на антери, кои содржале зрели Polenovi зрна. Првата успешна андрогенеза на пиперка е добиена во 1981 година од Dumas de Valux, et al. Имено, со култура од антери, авторот добива хаплоидни и дихаплоидни хибриди на пиперка, и тоа кај различни вариетети. Воедно испитувана е и стимулацијата на андрогенезата со температурен третман, како и со различни концентрации и комбинации на фитохормони во медиумот. Шематската илустрација на добивање на хаплоидни ембриони од изолирани микроспори е дадена на слика 1.

Од неодамна соматската ембриогенеза на пиперката е добиена во суспензија на калусни клетки во биореактори (Buyukalaca и Mavituna, 1996), каде е докажано дека главна улога во соматската ембриогенеза има кислородот.

Денес, андрогенезата во *in vitro* услови, базирана на 30 годишно истражување, претставува ефективен метод за индукција на хаплоиди (Колева-удева и Спасеноски 2005, Koleva-Gudeva et al., 2007, 2008).

Андрогенезата на пиперката е доста лимитирачки процес, кој е проеследен со многу лимитирачки фактори како: генотипот; структура и стадиум на микроспорите т.е. микроспорите се погодни за индукција на андрогенезата во фазата на првата поленова митоза или непосредно пред неа; генетската предиспозиција за соматската ембриогенеза; хормонална регулација во *in vitro* услови; условите на раст, како и многу други фактори. Науката сè уште нема доволно објаснувања за сите познати и непознати ограничувачки фактори за овој процес кај видовите од родот *Capsicum*.

Во Република Македонија современите биотехнолошки методи скоро и да не наоѓаат свое практично место во комерцијалното земјоделско производство. За самиот процес на андрогенеза овие се првите почетоци, кои даваат солидна надеж за инволвирање на науката во процесот на селекцијата. Така, со реализацијата на проектот беа разработени одделни етапи од процесот на индуцирањето на ембриогенезата во култура на антери од некои македонски сорти на пиперка, кои се од интерес за селекцијата, беа оптимизирани условите за развој на хаплоидните регенеранти, нивната микропропагација и дихаплоидизирање како и вклучувањето на одбраните форми во понатамошна селекција.

Со разработување на методологијата на предложениот проект може да се оптимизираат условите за индукција на ембриогенезата во култура на антери кај пиперка и да се зголеми ефикасноста на методологијата до ниво на завршна технологија. Со тоа се зголемува ефикасноста за проучување на хаплоидни и дихаплоидни растенија-регенеранти, кои пак од друга страна може да се вклучат во селекциските процеси за создавање на нови сорти и хибриди на пиперка.

Резултатите од овие истражувања ќе може да послужат како појдовен метод за добивање на хаплоиди, не само кај пиперката, туку и кај други култури. Тоа значи дека, се очекува посебен практичен придонес во биотехнологијата и во селекцијата на растенијата. Истражувањата имаат не само фундаментално туку и апликативно значење, особено во зголемувањето и збогатувањето на генофондот на пиперката.

Економскиот ефект е од несогледлива важност со тоа што се стабилизираат, подобруваат и се воведуваат нови генотипови на пиперка кои би го унапредиле процесот на креација на сорти кои допрва треба да се пласираат во македонското земјоделство.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА

#### 3.1. Стерилизација на пупки од *C. annuum* L. и изолирање на антери

За одредување на степенот на андрогензата на пиперка користени се пупки од вкупно 21 различни генотипови на пиперка (сорти и популации) кои се разликуваа и по потеклото на производството и сортни особини (Табела 1 и 6). Сите беа посадени во саксии во оранжериски услови (Слика 3), а растенијата за време на целиот вегетативен период беа редовно прихранувани, наводнувани и заштитувани од болести и штетници.

Како почетен материјал користени се незрелите пупки од пиперка (Слика 2), кои содржат антери (Слика 4а) со микроспори во стадиум на првата поленова делба или непосредно пред делбата (Слика 5 а.). Стерилизацијата на пупките се одвиваше на следниот начин: најпрво пупките се промиваат во водоводна вода; потоа следи промивање во дестилирана вода; потоа 15 секунди во 70%  $C_2H_5OH$ ; па 10 минути во 5%  $Ca(ClO)_2$  со 2-3 капки Tween 20, и на крај пупките се промиваат неколкупати во стерилна вода.

Изолираните антери (Слика 4 а, б) од 3 пупки потоа се поставуваат во петриеви садови со пречник од 5 cm и тоа со конкавната страна да го допираат индуктивниот медиум.

Табела 1. Користени генотипови во проектот и нивните шифри

Број	Шифра на генотипот	Генотип
1	МК1	Пиран
2	МК2	Куртовска капија BG
3	МК3	Куртовска капија TR
4	МК4	Златен медал ST
5	МК5	Куртовска капија МК
6	МК6	Бонбона
7	1	Слатко лута
8	3	Везано лута
9	4	Сиврија
10	5	Феферона
11	7	Златен медал SR
12	8	Куртовска капија SR
13	9	California wonder
14	15	Fehérözön
15	16	Rotund
16	1H	Pritavit F1
17	2H	Tomato shaped sweet
18	3H	Tura
19	4H	Majori
20	5H	Kincsem F1 HP 14
21	6H	Vitamin HPO 136

### **3.2. Одредување на стадиумот на микроспорите**

Стадиумот на делбата на микроспората е одредуван микроскопски со обојување на антерите со ацето кармин неколку минути, а потоа истите беа микроскопирани. Тоа обично е фаза на цветната пупка кога должината на цветните и венечните ливчина е еднаква и кога слободниот крај на антерата почнува да се обојува слабо виолетово (Слика 2).

Приготвувањето на бојата (ацето кармин) за одредување на стадиумот на микроспорите се врши на следниот начин: 1 g кармин се растворува во 45 ml глацијална оцетна киселина, се додава уште 55 ml дестилирана вода, и се става на вриење околу 5 минути. Потоа, растворот се лади, се филтрира, и за интензивирање на бојата се додава 1-2 капки железенхидроксид. На изолираните антери се капнува од ацето карминот и по неколку минути истите се мацерираат на микроскопско предметно стакло и се набљудуваа во кој стадиум е микроспората (Слика 5 а, б). Во култура за индукција на андрогенеза се поставуваат само оние антери кои содржат микроспори во или пред првата поленова делба. Андрогенетскиот потенцијал беше одредуван преку степенот на калусогенеза и способноста за формирање на ембриониди на повеќе различни хормонални подлоги со различни комбинации на фитохормони.

### **3.3. Состав на подлогите за култивирање на антерите**

Реализацијата на проектот започна со тестирање на пет различни индуктивни медиуми со три различни стрес - третмани, со цел да се констатира кој медиум и кој стрес третман е најпогоден за андрогенезата кај пиперката. Така, во истражувачката 2006 година како индуктивни медиуми за андрогенеза беа користени и CP (Dumas de Valux et al., 1981), MS (Murashige и Skoog, 1962), LS (Linsmaer и Skoog, 1965), N (Nitch, 1969) и NN (Nitch и Nitch, 1969) како двофазен медиум со носач. За NN медиумот носачите на антери, во вид на буквата М, беа приготвувани од стерилна филтер хартија и поставени во ерленмаерови тиквички на цврстата фаза, а течната фаза го натопува носачот од каде антерата ги прима потребните хранливи елементи и хормони. Течната и цврстата фаза се изотонични раствори, а разликата е само во агарот кој го нема во течната фаза.

Поставените антери беа инкубирани:

- 7 дена на темно и на  $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , а потоа во клима комора на  $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12 h светло / 12 h темно (George и Narayanaswamy 1973), на MS и N медиумите, и
- 7 дена на темно и на  $+7\pm 2^{\circ}\text{C}$ , а потоа во клима комора на  $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12 h светло / 12 h темно (Dolcet-Sanjuan et al. 1997) на NN и LS медиуми;
- првите 8 дена, антерите се инкубираат, на темно и на  $+35\pm 2^{\circ}\text{C}$ , а следните 4 дена во клима комора на  $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12 h светло / 12 h темно (Dumas de Valux et al., 1981) на CP медиум.

Индуктивните медиуми беа обогатени со следниот хормонален состав:

MS +  $1.0\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  KIN +  $0.01\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D +  $0.001\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  IAA ;

$N + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KIN} + 0.001 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ IAA};$   
 $LS + 3.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KIN} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ IAA};$   
 $NN + 0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KIN} + 0.001 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} 2,4\text{-D};$   
 $CP + 0.001 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KIN} + 0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} 2,4\text{-D}.$

Медиумите на Dumas de Valux et al., 1981 (дадени во табелите 3, 4 и 5) во текот на 2006 се покажаа како најповолни за андрогенеза и единствено на овој медиум беа индуцирани соматски ембриоиди. Заради тоа, во текот на 2007 и 2008 година истражувањата продолжија исклучиво со користење на топол стрес-третман на  $+35^{\circ}\text{C}$  на CP медиум по методот на гореспоменатиот автор.

Табела 2. Состав на LS (Linsmaer и Skoog, 1965), MS (Murashige и Skoog, 1962), N (Nitch, 1969) медиум, и на NN (Nitch и Nitch, 1969) двофазен медиум

макро и микро елементи	LS ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )	MS ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )	N ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )	NN ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650.00	1 650.00	720.00	720.00
$\text{KNO}_3$	1900.00	1 900.00	950.00	950.00
$\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	332.02	440.00	166.00	166.00
$\text{Ca}(\text{NO})_3 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	-	-	500.00	-
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	180.54	370.00	185.00	185.00
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170.00	170.00	6.80	6.80
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.20	6.20	10.00	10.00
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	16.90	22.30	18.94	18.94
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	8.60	8.60	10.00	10.00
$\text{Na}_2\text{Mo}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0.25	0.25	0.25	0.25
KJ	0.83	0.83	-	-
$\text{Cu SO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025	0.025
$\text{Co Cl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0.025	-	-	-
FeNaEDTA	36.70	-	36.70	36.70
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	-	33.3	-	-
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	-	27.8	-	-
<b>органски компоненти</b>				
сахароза	$20.00 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	$30.00 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	$30.00 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	-
малтоза	-	-	-	$20.00 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
агар	$8.00 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	$7.00 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	$8.00 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	$8.00 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
мио иноситол	$100.00 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$100.00 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$100.00 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$100.00 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
витамин B <sub>1</sub>	$4.40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$0.50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$0.50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
витамин B <sub>6</sub>	-	$1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$0.50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$0.50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
никотинска к-на	-	$0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$5.00 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$5.00 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
фолна киселина	-	-	$0.05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$0.05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
глицин	-	-	$2.00 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$2.00 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
биотин	-	-	$0.05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$0.05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Табела 3. Составот на CP, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> и V<sub>3</sub> (Dumas de Valux, et al., 1981) медиум

	CP	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>
	на литар			
SNGM macro	100 ml	100 ml	100 ml	-
MS macro	-	-	-	100 ml
Micro-2	10 ml	-	-	-
Micro-R	-	10 ml	10 ml	-
Micro-Heller	-	-	-	1 ml
F витамини	1 ml	1 ml	1 ml	-
Morel витамини	1 ml	1 ml	1 ml	2 ml
B <sub>12</sub> витамин	0.3 ml	-	-	-
Fe – хелат	1 ml	1 ml	1 ml	2 ml
2,4-D 0.1mg/ml	0.1 ml	-	-	-
кинетин 0.1mg/ml	0.1 ml	1 ml	20 ml	-
дестилирана вода	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml
сахароза	30 g	30 g	30 g	30 g
агар	10 g	10 g	10 g	10 g
pH	5.9	5.9	5.9	5.9

Табела 4. Состав на хранливите раствори SNGM macro, MS macro, Micro-2, и Micro Heller во медиумите по Dumas de Valux et al., (1981)

МАКРОЕЛЕМЕНТИ (mg·l <sup>-1</sup> )			МИКРОЕЛЕМЕНТИ (mg·l <sup>-1</sup> )			
	SNGM macro (10x)	MS macro (10x)		Micro-2 (100x)	Micro- R (100x)	Micro- Heller (100x)
KNO <sub>3</sub>	21 500	19 000	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	2213.0	2013.0	76.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	12 380	16 500	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	362.5	322.5	1000.0
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	4 120	3 700	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	315.0	155.0	1000.0
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	3 130	4 400	KJ	69.5	33.0	10.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 420	1 700	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	18.8	13.8	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	500	-	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	1.6	1.1	13.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	380	-	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1.6	1.1	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	340	-	AlCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	-	-	50.0
KCl	70	-	NiCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	-	-	30.0

Табела 5. Витамини и аминокиселини (mg/100 ml) во состав на медиумите по Dumas de Valux, et al., (1981)

	F (50x)	Morel (50x)
месо-иноситол	25	5 000
никотинска киселина	25	50
витамин B <sub>6</sub>	500	50
витамин B <sub>1</sub>	5	50
глицин	10	-
Са пантотенат	-	50
биотин	-	0,5

Периодот на индукција од 12 дена со температурен третман е неопходен за формирање на хаплоидни и спонтани двојно хаплоидни ембриоиди од микроспорите. Тој се одвива на СР медиумот во две фази и тоа:

- првите 8 дена, антерите се инкубираат, на темно и на  $+35\pm 2^{\circ}\text{C}$  ;
- а следните 4 дена во клима комора на  $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12 h светло / 12 h темно.

После 12 дена инкубација антерите беа пренесени на R<sub>1</sub> медиум на  $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12 h светло / 12 h темно, каде е одредуван андрогентскиот потенцијал преку процентот антери кои формирале хаплоидни ембриоиди.

R<sub>2</sub> медиумот се користи во случај на стопирање на развојот на ембрионите во торпедо стадиум. Во случај кога ембрионите потполно се бели и мазни се отстрануваат од антерата и се пасажираат на R<sub>2</sub> медиум, каде не смеат да се држат повеќе од една недела.

Формираните хаплоидни изданоци беа пасажирани на V<sub>3</sub> медиум, каде се одвиваше и ризогенезата, после која изданоците беа спремни за адаптација за надворешна средина.

### 3.4. Услови за одгледување на културите

Културите од антери беа поставени во петриеви садови на индуктивните медиум (поглавје 3.3), а по индукцијата беа чувани во клима комора (Слика 14) со услови:

- температура од  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ;
- релативна влажност од 50%;
- фотопериодизам од 12 h светло / 12 h темно, и
- интензитет на светлина од  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

### 3.5. Поставување на експериментот во лабораториски услови

Целокупната реализација на предложениот проект претставува своевиден спој и комбинација на традиционалните селекциони методи со современите техники на *in vitro* регенерација.

За одредување на степенот на андрогенезата на пиперка беа користени пупки од различни сорти на пиперка. Сите сорти, донатори на антери, беа одгледувани во оранжериски услови и на отворено, под контролирани услови, а растенијата донатори за време на целиот вегетативен период редовно ќе се прихранувани, наводнувани и заштитувани од болести и штетници.

Како почетен материјал беа користат незрели пупки од пиперка, кои содржат антери со микроспори во стадиум на првата поленова делба или непосредно пред делбата. Стадиумот на делбата на микроспората беше одредуван микроскопски со обојување на антерите со ацето кармин неколку минути, а потоа истите се микроскопираат. Тоа обично е фаза на цветната пупка кога должината на цветните и венечните ливчина е еднаква и кога слободниот крај на антерата почнува да се обојува слабо виолетово.

За индукција на хаплоиди/дихаплоиди од пиперка во услови *in vitro* беа користени медиумите на Dumas de Valux, Cp, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, V<sub>3</sub> (Dumas de Valux, 1981). Периодот на индукција од 12 дена со температурен третман е неопходен за формирање на хаплоидни и спонтани двојно хаплоидни ембриониди од микроспорите.

Како индуктивни медиуми за андрогенеза покрај Cp беа користени и MS (Murashige и Skoog, 1962), (LS Linsmaer и Skoog, 1965) медиум, N (Nitch, 1969), NN (Nitch и Nitch, 1969) како двофазен медиум со носач.

Различни хранливи медиуми со различни по состав и количина аплицирани растителни хормони, како и различни индукциони третмани беа употребени за да се испита влијанието на составот на медиумот, растителните хормони и индукционите третмани на ниво на андрогенеза кај различните генотипови на пиперка:

- Инкубационен третман во ладни услови (на 7°C) во темно за 7 дена и потоа пренесување на антерите во на светло (12 часови фотопериод на 25°C) за 4 недели на LS и NN медиуми, каде беа инкубирани одреден број антери од 9 генотипови пиперка;
- Инкубационен третман во топли услови (на 25°C) во темно за 7 дена и потоа пренесување на антерите во услови на светлина (12 часови фотопериод на 25°C) за 4 недели на MS и N медиум, каде беа инкубирани одреден број антери од 9 генотипови пиперка
- Инкубационен третман во топли услови (на 35 °C) во темно за 8 дена и потоа пренесување на антерите во услови на светлина (12 часови фотопериод на 25°C) за 4 недели на MS медиум, каде беа инкубирани одреден број антери од 10 генотипови пиперка
- Инкубационен третман на MS медиум во топли услови (на 35°C) во темно за 8 дена и 4 дена светло (12 часови фотопериод на 25°C), и потоа пренесување на антерите за 4 недели на R1 медиум, , каде беа инкубирани одреден број антери од 10 генотипови пиперка
- Инкубационен третман во топли услови (на (на 35°C) во темно за 8 дена и 4 дена светло (12 часови фотопериод на 25°C) на Cp медиум, и потоа



пренесување на антерите за 4 недели на R<sub>1</sub> медиум, каде беа инкубирани одреден број антери од 13 генотипови пиперка.

Јачината на светлината од 30-40 mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> беше иста за сите медиуми и индукициони третмани.

Медиумите кои беа користени во тек на истражувањето беа со следниот хормонален состав:

- LS (Linsmaer и Skoog, 1965) со 3,0 mg·l<sup>-1</sup> кинетин и 1,0 mg·l<sup>-1</sup> IAA
- NN (Nitch и Nitch, 1969) со 0,01 mg·l<sup>-1</sup> кинетин и 0,001 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D
- MS (Murashige и Skoog, 1962) со 1,0 mg·l<sup>-1</sup> кинетин, 0,01 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D и 0,001 mg·l<sup>-1</sup> IAA
- MS (Murashige и Skoog, 1962) со 0,1 mg·l<sup>-1</sup> кинетин и 0,04 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D
- Cp (Dumas de Valux et al., 1981) со 0,01 mg·l<sup>-1</sup> кинетин и 0,01 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D

Во периодот јули 2006 до јули 2008 дваесет и еден генотип на пиперка (*Capsicum annuum* L.) беа употребени како почетен материјал за индукција на андрогенеза користејќи медиуми со различен хормонален состав и различни стрес третмани. Генотиповите на пиперка се разликуваат во вегетациските и плодовите карактеристики. Исто така се разликуваат според земјата на потекло (Табела 6).

Семето од различните генотипови на пиперка беше посеано во контејнери и 10 растенија од секој генотип беа пресадени во полиетиленски саксии. Растенијата беа одгледувани во оранжериски услови. За време на вегетацијата беа користени вообичаените практики за наводнување и прихрана. Растенијата кои се мајки донори на антери (Слика 3) беа користени во текот на 4 недели после појавувањето на првите пупки. Пупките беа собирани кога должината на венчето беше приближно иста со должината на чашката или малку подолга.

Одреден број на антери од секој генотип беа култивирани на различните хранливи медиуми кои потоа беа поставени во различни индуктивни услови.

Во соработка со научноистражувачкиот тим од Бугарија добиените регенерант - растенија беа истражувани цитогенетски, а потоа за истите беа вклучени во понатамошната селекција.

### 3.6. Одредување на кариотип митотскиот циклус на пиперката

За утврдување на степенот на плоидноста кај андрогентските линии на пиперка беше направен кариограм на четирите сорти на пиперка Куртовска капија, Пиран, Златен медал и Фехерозон од кој беше и добиен семенски материјал. Исто така кариограм беше направен и кај контролни растенија кај кои семето беше добиено по конвенционален пат.

За кариолошката анализа т.е. за утврдување на бројот на хромозоми, беа користени меристемските врвови од коренчиња на пиперка, според методот на Tio

и Levan (1950). Семето од горенаведените сорти и нивните соодветни контроли беше поставено на 'ртење, а од кореновите врвови беа отстранети меристемските врвови и поставени на предтретман во 8-хидроксикуинолин 0,002 M за време од 12-24 часа на собна температура. Потоа материјалот беше фиксиран во алкохол : оцетна киселина (1:3) па хидролизиран со HCl 1N на 60° C за време од 9 минути. На крај, вака подготвениот материјал, беше обојуван по методот на Konstantinov et al., 1985 со 1 - 1,5 % Гомори хематоксилин. Кореновите врвови беа набљудувани под микроскоп, на препарати подготвени на предметно стакло по „сквош“, методот. Бројот на хромозомите е одреден во семенскиот материјал кај сите андрогентски добиени линии и нивните соодветни контролни растенија (Слика 15).

Овие кариолошки испитувања се изведени во соработка со Природно-математичкиот факултет на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје на Институтот по Биологија во лабораторијата за генетика.

### **3.7. Поставување на експериментот на терен (оранжерија и пластеник)**

Семето од растенијата собрано во текот на 2006 година од андрогенетските растенија беше искористено за формирање на андрогенетски линии пиперка кои беа карактеризирани за различни параметри (Табела 13). Различен број растенија од секоја андрогенетска линија пиперка и растенија од изворниот генотип кој беше користен за индукција на андрогенеза (контролни растенија) беа расадени во пластеник (Слика 12) и оранжерија (Слика 11).

И во двата експерименти беа следени фенолошките фази кај растенијата, и тоа: дата на сеење на семето; дата на расадување на растенијата; дата на цвeteње (почетно и масовно); дата на плодносење (почетно и масовно); дата на зреење (технолошка и ботаничка фаза).

Во различните фенолошки фази од развојот на растенијата беа следени и мерени различни морфолошки параметри: висина на растението; дебелина на стеблото на растението; должина на интернодии; број на листови; должина на листот; ширина на листот; број на цветови.

Плодовите се најважни органи кај растенијата бидејќи тие обезбедуваат семе за понатамошните истражувања. Одреден број на морфолошки карактеристики беа мерени во технолошката и ботаничката фаза кај плодовите: број на плодови во технолошка фаза; број на плодови во ботаничка фаза; број на плодови во технолошка фаза на берба; број на плодови во ботаничка фаза на берба; должина на плод (cm); ширина на плод (cm); дебелина на перикарп (mm); број на плодови комори; содржина на суви материи (%); број на семки по плод; сува маса на семки по плод (g); сува маса на 1000 семки (g).

Семето од различни плодови од различните андрогенетски линии беше собрано одделно, обележано и складирано во ген-банката на Земјоделски

факултет, Универзитет „Гоце Делчев” - Штип во Институтот за земјоделство во Струмица.

Исто така беа соберени и примероци од листови и плодови во различните развојни фази на растенијата и фази на зреење на плодовите за анализа на содржината на микро и макроеlementи.

### **3.8. Статистичка обработка на податоци**

Резултатите добиени во текот на истражувањето беа статистички обработени со статистичката програма SPSS 10.0. Сите податоци кои се однесуваат на процентот на калусогенеза, процентот на ембриогенетски антери и бројот на ембриони на 100 антери беа предмет на анализа на варијанса (ANOVA), а средните вредности беа евалуирани кога прагот на сигнификантност е  $p < 0.05$  користејќи Duncan's Multiple Range Test.

## **4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА**

### **4.1. Резултати од лабораториски истражувања во *in vitro* култура од антери од пиперка**

Во периодот јули 2006 год. до јули 2008 год. во Земјоделски факултет при Универзитет „Гоце Делчев” – Штип (поранешен Институтот за јужни земјоделски култури – Струмица) беа реализирани различни научни активности.

Во периодот јули 2006 год. до јули 2008 год., дваесет и еден генотипови на пиперка (*Capsicum annuum* L.) беа употребени како почетен материјал за индукција на андрогенеза користејќи медиуми со различен хормонален состав и различни стрес третмани. Генотиповите на пиперка се разликуваат во вегетациските и плодовите карактеристики. Исто така се разликуваат според земјата на потекло (Табела 6).

Семето од различните генотипови на пиперка беше посеано во контејнери и по 10 растенија од секој генотип беа пресадени во полиетиленски саксии. Растенијата беа одгледувани во оранжериски услови. За време на вегетацијата беа користени вообичаените практики за наводнување и прехрана. Растенијата кои беа мајки донори на антери беа користени во текот на 4 недели после појавувањето на првите пупки. Пупките беа собирани кога должината на венчето беше приближно иста со должината на чашката или малку подолга.

Одреден број на антери од секој генотип беа култивирани на различните хранливи медиуми кои потоа беа поставени во различни индуктивни услови.

Различни хранливи медиуми со различни по состав и количина аплицирани растителни хормони, како и различни индукциони третмани беа употребени за да се испита влијанието на составот на медиумот, растителните хормони и индукционите третмани на ниво на андрогенеза кај различните генотипови на пиперка:

- Инкубационен третман во ладни услови (на 7°C) во темно за 7 дена и потоа пренесување на антерите во на светло (12 часови фотопериод на 25°C) за 4 недели на LS и NN медиуми, каде беа инкубирани одреден број антери од 9 генотипови пиперка;
- Инкубационен третман во топли услови (на 25°C) во темно за 7 дена и потоа пренесување на антерите во услови на светлина (12 часови фотопериод на 25°C) за 4 недели на MS и N медиум, каде беа инкубирани одреден број антери од 9 генотипови пиперка;
- Инкубационен третман во топли услови (на 35 °C) во темно за 8 дена и потоа пренесување на антерите во услови на светлина (12 часови фотопериод на 25°C) за 4 недели на MS медиум, каде беа инкубирани одреден број антери од 10 генотипови пиперка;
- Инкубационен третман на MS медиум во топли услови (на 35°C) во темно за 8 дена и 4 дена светло (12 часови фотопериод на 25°C), и потоа пренесување на антерите за 4 недели на R1 медиум, , каде беа инкубирани одреден број антери од 10 генотипови пиперка;
- Инкубационен третман во топли услови (на (на 35°C) во темно за 8 дена и 4 дена светло (12 часови фотопериод на 25°C) на Ср медиум, и потоа пренесување на антерите за 4 недели на R<sub>1</sub> медиум, , каде беа инкубирани одреден број антери од 13 генотипови пиперка.

Јачината на светлината од 30-40 mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> беше иста за сите хранливи медиуми и сите индуccionи третмани.

Медиумите кои беа користени во тек на истражувањето беа обогатени со следните хормонални комбинации:

- LS (Linsmaer и Skoog, 1965) со 3,0 mg·l<sup>-1</sup> KIN и 1,0 mg·l<sup>-1</sup> IAA
- NN (Nitch и Nitch, 1969) со 0,01 mg·l<sup>-1</sup> KIN и 0,001 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D
- MS (Murashige и Skoog, 1962) со 1,0 mg·l<sup>-1</sup> KIN, 0,01 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D и 0,001 mg·l<sup>-1</sup> IAA
- MS (Murashige и Skoog, 1962) со 0,1 mg·l<sup>-1</sup> KIN и 0,04 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D
- Ср (Dumas de Valux et al., 1981) со 0,01 mg·l<sup>-1</sup> KIN и 0,01 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D

Антерите беа редовно набљудувани и сите промени се бележани. За време на инкубацијата, антерите беа боени со ацетокармин, со методот на размаз на микроскопски стакла и беа набљудувани под микроскоп за да се забележи било каква промена на микроскопско ниво. Кај испитуваните генотипови кои реагираа со калусогенеза беше бележан процентот на калус (Табела 7, Табела 8, Табела 9). Кај генотиповите кои реагираа со продукција на соматски ембриониди беше одредувано: број на култивирани антери, број на појавени ембриониди, ембриогенетски антери (%), број на ембриониди на 100 антери и број на ембриониди регенерирани во растенија (Табела 10, Табела 11, Табела 12). Андрогенскиот потенцијал беше одреден од процентот на ембриогенетските антери според класификацијата на Mityko et al. (1995).

Во Табела 7 се презентирани резултатите од индукција на антери на различни медиуми (MS, N, LS, NN и CP) со ладен и топол стрес третман. Индукцијата на антери резултираше со различен процент на калусогенеза кај различните генотипови пиперка.

Во случај кога антерите беа култивирани на MS медиум со третман од 8 дена на 35°C во темно и пренесени на MS медиум на 25°C на светло за 4 недели беше добиен различен процент на калусогенеза но не и ембриогенеза (Табела 8). Во случајот како беше користен MS медиум за инкубација на антерите 8 дена на 35°C и темно и 4 дена на 25°C и светло, а потоа антерите беа префрлени на R<sub>1</sub> медиум за 4 недели беше добиен различен процент на калусогенеза но не и ембриогенеза (Табела 9).

Одреден број на антерите беа поставени на MS медиум, каде беа аплицирани кинетин (0.1 mg·l<sup>-1</sup>) и 2,4 D (0.04 mg·l<sup>-1</sup>), стрес третман од 4 дена на 35°C и пасажирање на антерите на MS медиум со кинетин (0.1 mg·l<sup>-1</sup>). Беа следени промените на антерите во однос на андрогенеза и/или калусогенеза (Табела 8).

Одреден број на антерите беа поставени на MS медиум, каде беа аплицирани кинетин (0.1 mg·l<sup>-1</sup>) и 2,4 D (0.04 mg·l<sup>-1</sup>), стрес третман од 4 дена на 35°C и пасажирање на антерите на R<sub>1</sub> медиум (Dumas de Valux et al., 1981). Беа следени промените на антерите во однос на андрогенеза и/или калусогенеза (Табела 9).

Резултатите од лабораториските истражувања за индукција на соматските ембриониди во истражувачката 2006 год. се дадени во табела 10, а за истражувачката 2007 во табела 11. Андрогенетскиот одговор на сите 21 различни генотипови на пиперка вклучени во истражувањето од 2006 - 2008 година дадени се во табела 12.

Од резултатите презентирани во Табела 12, од вкупно 21 различни генотипови вклучени во истражувањето, 12 генотипови на пиперка дале различен процент на ембриогенетски антери, а андрогенетскиот одговор е:

- **Добар** кај 2 генотипа - Тура и Féherözön;

- **Просечен** кај 4 генотипа - Златен медал CP, Pritavit F1, Мајори и Клифорниски чудо;
- **Слаб** кај 6 генотипа - Куртовска капија CP; Куртовска капија БГ; Пиран; Златен медал ШТ; Доматовидна блага и Слатко лута;
- **Без андрогенетски одговор** кај 9 генотипови – Феферона, Везаналута, Сиврија, Ротунд, Куртовска капија МК, Куртовска капија ТУ, Бонбона, Kincsem HP14 и Vitamin HPO13G.

Ембрионите кои се појавуваат од антерите беа префрлени во стаклени теглички на V<sub>3</sub> подлога без додавање на хормони (Dumas de Valux et al., 1981) за нивно понатамошно развивање во растенија и тегличките беа поставени во комора на 25°C со фотопериод од 12 часови светло и 12 часови темно на 30-40 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Во двете експериментални години вкупно 35 ембриони беа регенерирани во целосно развиени растенија

#### 4.2. Потекло на почетниот материјал за селекција

Почетниот материјал за селекција на андрогенетските линии на пиперка потекнува од лабораториските истражувања водени во 2005 година како проектна активност во реализацијата на националниот проект „Создавање на хаплодна пиперка (*Capsicum annuum* L.) во *in vitro* услови” под раководство на главниот истражувач Проф. д-р Лилјана Колева-Гудева (2004-2006 год.). Како континуиран истражувачки процес, во овој билатерален проект (2006-2008 год.), во текот на 2006 година добиените ембриони успешно се регенерираа од лабораториски во оранжериски услови и тоа од 4 генотипови: Куртовска кпија, Златен медал, Пиран и F  her  z  n (Слика 14), а само 14 растенија беа фертилни и дадоа плодови со семе (Табела 13). Растенијата кои беа адаптирани и аклиматизирани во оранжериски услови беа ставени под дополнителна заштита со покривка од агрилно платно за да се спречи вкрстеното опрашување помеѓу различните генотипови.

Колекционираното семе од овие растенија (Табела 14) беше предмет на истражување во карактеризацијата на поставените андрогенски линии во наредните 2007 и 2008 година и во оранжериски и во пластенички услови. Процесите на карактеризација и евалуација на овие андрогентски линии воедно беше и главна проектна активност во имплементацијата и реализацијата на овој проект билатерален МК-БГ проект. Размената на искуства и идеи со партнерите од Бугарија од Институтот за зеленчукови култури „Марица,, - Пловдив беше од големо значење во имплементацијата на овој проект.

#### 4.3. Резултати од теренски истражувања (пластеник и оранжерија)

Семето од растенијата собрано во текот на 2006 година од андрогенетските растенија беше искористено за формирање на андрогенетски линии пиперка кои беа карактеризирани за различни параметри (Табела 14 и 15).

Различен број растенија од секоја андрогенетска линија пиперка и растенија од изворниот генотип кој беше користен за индукција на андрогенеза (контролни растенија) беа расадени во пластеник и оранжерија.

**Во оранжериски услови** и во двете истражувачки години експериментот беше поставен по методот на случаен блок систем од андрогенетските линии од сортите Куртовска капија, Пиран и Féherözön во четири повторувања. По 10 растенија од секоја андрогенетска линија како и по 10 растенија од контролата беа посадени во саксии наводнувани и прихранувани со систем капка по капка (по систем на фертигација), регуларно и превентивно третирани од болести и штетници (Слика 11).

**Во пластенички услови** селектираните андрогенетски линии од сортите Куртовска капија, Златен медал, Пиран и Féherözön беа поставени во леа, а во фазата на цветење и почетно плодносење секоја линија посебно беше покриена со агрилно платно заради заштита од страно опрашување помеѓу различните линии. Во фазата на масовно плодносење платното беше отстранувано, а во карактеризација и евалуација на плодовите беа селектирани плодови кои биле формирани додека растенијата биле заштитени од страноопрашување. Растенијата беа регуларно наводнувани и прихранувани и превентивно третирани од болести и штетници (Слика 12).

И во двата експерименти беа следени фенолошките фази кај растенијата, и тоа:

- дата на сеење на семето
- дата на расадување на растенијата
- дата на цветење (почетно и масовно)
- дата на плодносење (почетно и масовно)
- дата на зреење (технолошка и ботаничка фаза)

Во различните фенолошки фази од развојот на растенијата беа следени и мерени различни морфолошки параметри:

- висина на растението
- дебелина на стеблото на растението
- должина на интернодии
- број на листови
- должина на листот
- ширина на листот
- број на цветови

Плодовите се најважни органи кај растенијата бидејќи тие обезбедуваат семе за понатамошните истражувања. Одреден број на морфолошки карактеристики беа мерени во технолошката и ботаничката фаза кај плодовите:

- број на плодови во технолошка фаза
- број на плодови во ботаничка фаза
- број на плодови во технолошка фаза на берба
- број на плодови во ботаничка фаза на берба
- должина на плод (cm)

- ширина на плод (cm)
- дебелина на перикарп (mm)
- број на плодови комори
- содржина на суви материи (%)
- број на семки по плод
- сува маса на семки по плод (g)
- сува маса на 1000 семки (g)

Средните вредности за различните параметри мерени кај плодовите од контролните генотипови и андрогенетските линии во технолошка и во ботаничка зрелост се прикажани табеларно во Табела 16, 17, 18 и 19 за истражувачката 2007 година.

Средните вредности за различните параметри мерени кај плодовите од контролните генотипови и андрогенетските линии во технолошка и во ботаничка зрелост се прикажани табеларно во Табела 20, 21, 22 и 23 за истражувачката 2008 година.

Семето од различни плодови од различните андрогенетски линии беше собрано одделно, обележано и складирано во Ген-банката на Земјоделски факултет во Струмица.

Исто така беа соберени и примероци од листови и плодови во различните развојни фази на растенијата и фази на зреење на плодовите за анализа на содржината на микро и макроеlementи.



Табела 6. Генотипови пиперка користени како донори на антери во експериментална година 2006 и експерименталната година 2007

Б р	Шифра	Таксономска класификација <i>Capsicum annuum</i> L.	Генотип	Земја на потекло	Опис на генотипот
1	МК1	ssp. <i>macrocarpum</i> ser. var. <i>longum</i> Sent	пиран	Македонија	Долга, средно лута
2	МК2	ssp. <i>macrocarpum</i> ser. var. <i>grosu</i> m Sent	куртовска капија BG	Бугарија	Слатка, индустриска
3	МК3	ssp. <i>macrocarpum</i> ser. var. <i>grosu</i> m Sent	куртовска капија TR	Турција	Слатка, индустриска
4	МК4	ssp. <i>macrocarpum</i> ser. var. <i>grosu</i> m Sent	златен медал ŠT	Македонија	Бела, долга
5	МК5	ssp. <i>macrocarpum</i> ser. var. <i>grosu</i> m Sent	куртовска капија МК	Македонија	Слатка, индустриска
6	МК6	spp. <i>microcarpum</i> var. <i>abbreviatum</i>	бонбона	Македонија	Шипка, лута
7	1	ssp. <i>macrocarpum</i> ser. var. <i>longum</i> Sent	слатко лута	Македонија	Долга, средно лута
8	3	ssp. <i>macrocarpum</i> ser. var. <i>longum</i> Sent	везана лута	Македонија	Долга, лута
9	4	ssp. <i>macrocarpum</i> ser. var. <i>longum</i> Send	сиврија	Македонија	Долга, средно лута
10	5	ssp. <i>microcarpum</i> var. <i>acuminatum</i>	феферона	Македонија	Феферона, лута
11	7	ssp. <i>macrocarpum</i> ser. var. <i>grosu</i> m Sent	златен медал SR	Македонија	Бела, долга
12	8	ssp. <i>microcarpum</i> ser. var. <i>grosu</i> m Sent	куртовска капија SR	Македонија	Слатка, индустриска
13	9	ssp. <i>macrocarpum</i> var. <i>dolma</i>	California wonder	Србија	Бабура, слатка
14	15	ssp. <i>macrocarpum</i> var. <i>dolma</i>	Féherözön	R. Hungary	Бабура, слатка
15	16	ssp. <i>macrocarpum</i> var. <i>rotundum</i>	Rotund	Македонија	Доматовидна, слатка
16	1H	ssp. <i>macrocarpum</i> var. <i>rotundum</i>	Pritavit F1	Унгарија	Доматовидна, слатка
17	2H	ssp. <i>macrocarpum</i> var. <i>rotundum</i>	Tomato shaped sweet	Унгарија	Доматовидна, слатка
18	3H	ssp. <i>macrocarpum</i> var. <i>rotundum</i>	Tura	Унгарија	Доматовидна, слатка
19	4H	ssp. <i>macrocarpum</i> var. <i>dolma</i>	Majori	Унгарија	Бабура, слатка
20	5H	ssp. <i>macrocarpum</i> var. <i>rotundum</i>	Kincsem F1 HP14	Унгарија	Доматовидна, слатка
21	6H	ssp. <i>macrocarpum</i> var. <i>rotundum</i>	Vitamin HPO 136	Унгарија	Доматовидна, слатка

Табела 7. Индукција на калус (%) на антери од различни генотипови на пиперка култивирани на различни медиуми со ладен и топол пред третман.

	Генотипови								
Третман	<i>феферона</i>	<i>слатко лута</i>	<i>везена лута</i>	<i>сиврија</i>	<i>златен медал</i>	<i>куртовска капија</i>	California Wonder	<i>ротунд</i>	Féherözön
Бр. на индуцирани антери	396	428	360	405	297	352	429	331	301
MS, 25 °C	36.49 a	48.90 a	30.98 a	11.42 a	14.91 a	14.91 a	21.10 b	10.06 b	4.94 bc
N, 25 °C	58.88 a	34.00 b	9.84 b	14.42 a	9.47 bc	8.04 b	30.66 a	9.26 b	4.78 bc
LS, 7 °C	26.24 bc	34.40 b	33.33 a	18.03 a	6.66 c	15.22 a	13.67 b	17.35 a	13.44 a
NN, 7 °C	19.37 c	17.44 c	5.03 b	18.25 a	11.40 b	9.33 b	14.96 b	9.28 b	11.30 ab
CP, 35 °C	0.00 d	6.80 c	27.85 a	14.23 a	7.33 c	8.26 b	15.13 b	19.00 a	3.92 c

Табела 8. Процент на калусирање на антери од различни сорти пиперка инкубирани и пасажирани на MS медиум

Сорта	Број на култивирани антери	% на калусогенеза
златен медал	120	11.67 c
куртовска капија	120	15.00 bc
пиран	120	50.00 ab
куртовска капија БГ	120	25.00 abc
златен медал ШТ	120	34.33 abc
Feherozon	120	0.00
Pritavit F1	60	56.67 a
доматовидна блага	120	22.50 abc
Tura	180	16.75 bc
Majori	100	0.00

Табела 9. Процент на калусирање на антери од различни сорти пиперка инкубирани на MS и пасажирани на Ср медиум

Сорта	Број на култивирани антери	% на калусогенеза
златен медал	130	8.75 a
куртовска капија	60	0.00
пиран	130	3.75 a
куртовска капија БГ	140	0.00
златен медал ШТ	140	0.00
Feherozon	130	0.00
Pritavit F1	190	11.97 a
доматовидна блага	150	0.00
Tura	130	0.00
Majori	130	0.00

Табела 10. Индукција на андрогенеза кај различни сорти на пиперка на СР медиум по методот на Dumas de Valux et al. (1981) во текот на експериментот во 2006 година

Сорта	Број на култивирани антери	Број на појавени ембриони	Ембриогенетски антери (%)	Број на ембрион и на 100 антери	Бр. на ембриони регенерирани во растенија	Ембриони регенерирани во растенија (%)	Андрогенетски одговор
Tura	300	18	17.05	17.06	5	11.11	Добар
Feherozon	330	27	12.08	12.08	19	70.37	Просечен
Pritavit F1	330	12	9.23	9.39	2	16.67	Просечен
Majori	330	7	5.83	6.73	0	0.00	Слаб
доматовидна блага	360	4	4.17	4.54	2	50.00	Слаб
куртовска капија СР	335	1	4.00	5.88	1	100.00	Слаб
златен медал ШТ	300	1	1.67	1.67	1	100.00	Слаб
златен медал СР	350	/	/	/	/	/	Нема
куртовска капија BG	350	/	/	/	/	/	Нема
пиран	335	/	/	/	/	/	Нема

Табела 11. Индукција на андрогенеза кај различни сорти на пиперка на Ср медиум по методот на Dumas de Valux et al. (1981) во текот на експериментот во 2007 година.

Сорта	Број на култивиран и антери	Број на појавени ембриони	Ембриогенетски антери (%)	Број на ембриони на 100 антери	Бр. на ембриони регенерирани во растенија	Регенерирани во растенија (%)	Андрогенетски одговор
<i>пиперан</i>	300	0	0	/	/	/	Нема
<i>куртовска капија</i> БГ	400	0	0	/	/	/	Нема
<i>златен медал</i> ШТ	300	0	0	/	/	/	Нема
<i>златен медал</i> СР	300	0	0	/	/	/	Нема
<i>к. капија</i> СР	300	0	0	/	/	/	Нема
California wonder	300	0	0	/	/	/	Нема
Feherozon	335	0	0	/	/	/	Нема
Pritavit F1	265	0	0	/	/	/	Нема
<i>доматовидна блага</i>	250	0	0	/	/	/	Нема
Tura	410	5	1.57	3.35	3	60	Слаб
Majori	300	1	0.69	2.27	0	0	Слаб
Kincsem F1 HP14	300	0	0	/	/	/	Нема
Vitamin F1 HPO13G	300	0	0	/	/	/	Нема

Табела 12. Андрогенетски одговор на антери од различни сорти пиперка поставени на Ср медиум по методот на Dumas de Valux et al. (1981) во периодот од 2006 до 2008 година

Сорта	Вкупен број на култивирани антери	Ембриогенетски антери (%)	Број на ембриони на 100 антери	Андрогенетски одговор
1. Féherözön	1502	17.39 ab	32.60 ab	Добар
2. Tura	300	17.05 a	17.05 bc	Добар
3. <i>златен медал</i> CP	1031	6.12 abc	8.97 bc	Просечен
4. Pritavit F1	330	9.23 abc	9.39 bc	Просечен
5. Majori	330	5.83 abc	6.73 c	Просечен
6. California Wonder	151	6.67 abc	5.67 c	Просечен
7. <i>куртовска капија</i> CP	875	2.73 bc	10.20 bc	Слаб
8. <i>пиран</i>	823	5.03 abc	34.05 ab	Слаб
9. <i>златен медал</i> ИТ	723	4.29 bc	18.57 bc	Слаб
10. <i>куртовска капија</i> BG	620	2.90 bc	50.55 a	Слаб
11. <i>доматовидна блага</i>	360	4.17 bc	4.54 c	Слаб
12. <i>слатко лута</i>	140	2.43 bc	3.33 c	Слаб
13. <i>феферона</i>	79	0.00	0.00	Нема
14. <i>везена лута</i>	83	0.00	0.00	Нема
15. <i>сиврија</i>	104	0.00	0.00	Нема
16. <i>ротунд</i>	109	0.00	0.00	Нема
17. <i>куртовска капија</i> МК	122	0.00	0.00	Нема
18. <i>куртовска капија</i> TU	236	0.00	0.00	Нема
19. <i>бонбона</i>	270	0.00	0.00	Нема
20. Kincsem F1 HP14	300	0.00	0.00	Нема
21. Vitamin F1 HPO13G	300	0.00	0.00	Нема

Табела 13. Генотипови на целосно регенерирани фертилни андрогенетски растенија.

Генотип	Код на генотипот	Број на целосно развиени фертилни растенија
куртовска капија CP	8	3
пиран	МК1	2
златен медал	7	2
Féherőzön	15	5
Pritavit F1	1Н	1
Majori	4Н	1

Табела 14. Семе собрано од различни генотипови на пиперка преку андрогенеза

Генотип	Ратение / плод	Бр. на семки по плод	Дата на собирање
куртовска капија CP	2/8 (*) - плод 1	22	28/07/2006
куртовска капија CP	2/8 (*) - плод 2	7	28/07/2006
куртовска капија CP	2/8 (*) - плод 3	1	28/07/2006
куртовска капија CP	2/8 (*) - плод 4	3	28/07/2006
куртовска капија CP	14/8 - плод 1	92	08/08/2006
куртовска капија CP	14/8 - плод 1	71	12/10/2006
куртовска капија CP	2/8 - плод 1	62	12/10/2006
куртовска капија CP	2/8 - плод 1	12	12/10/2006
куртовска капија CP	2/8 - плод 2	12	12/10/2006
златен медал CP	1/7 - плод 1	80	08/08/2006
златен медал CP	1/7 - плод 1	100	12/10/2006
златен медал CP	1/7 - плод 2	103	12/10/2006
златен медал CP	14/7 - плод 1	7	12/10/2006
Пиран	14/1 - плод 1	37	28/07/2006
Пиран	14/1 (1) плод 1	35	08/08/2006
Пиран	14/1 (2) плод 1	13	08/08/2006
Пиран	14/1 (2) плод 2	28	08/08/2006
Пиран	14/1 (2) плод 3	25	08/08/2006
Пиран	14/1 (1) плод 1	18	12/10/2006
Пиран	14/1 (2) плод 1	21	12/10/2006
Пиран	14/1 (2) плод 2	38	12/10/2006
фехерозон	Раст. 7 плод 1	49	28/07/2006
фехерозон	Раст. 11 плод 1	18	28/07/2006
фехерозон	Раст. 6 плод 1	57	08/08/2006
фехерозон	Раст. 6 плод 2	30	08/08/2006
фехерозон	Раст. 11 плод 1	16	12/10/2006
фехерозон	Раст. 1 плод 1	22	06/11/2006
фехерозон	Раст. 6 плод 1	17	06/11/2006
фехерозон	Раст. 6 плод 2	10	06/11/2006
фехерозон	Раст. 6 плод 3	43	06/11/2006
фехерозон	Раст. 7 плод 1	71	06/11/2006
фехерозон	Раст. 8 плод 1	91	06/11/2006

Табела 15. Андрогенетски линии од *Capsicum* spp. добиени со процесот на андрогенеза од комерцијални сорти поставени во опити за карактеризација во пластеник и во оранжериски услови.

Бр.	Шифра	Генотип на мајчино растение	Шифра на андрогенско растение	Број на растенија за карактеризација		Услови на одгледување
				Пластеник	Оранжерија	
1	KK1	куртовска капија CP	2/8	3	40	Пластеник/ оранжерија
2	KK2	куртовска капија CP	14/8	1	40	Пластеник/ оранжерија
3	KK3	куртовска капија CP	2/8*	2	40	Пластеник/ оранжерија
4	ZM1	златен медал CP	1/7	9	/	Пластеник
5	ZM2	златен медал CP	14/7	2	/	Пластеник
6	P3	пиран	14/1 (1)	2	40	Пластеник/ оранжерија
7	P4	пиран	14/1 (2)	13	40	Пластеник/ оранжерија
8	F5	Fehérözön	7	22	40	Пластеник/ оранжерија
9	F6	Fehérözön	6	14	40	Пластеник/ оранжерија
10	F7	Fehérözön	5	1	40	Пластеник/ оранжерија
11	F8	Fehérözön	11	1	/	Пластеник



Табела 16. Морфолошки и производствени карактеристики на плодови кај различни генотипови типови пиперка во технолошка зрелост одгледувани во оранжерија во 2007 (изразени во средни вредности)

Шифра на генотип	Должина на плод (cm)	Ширина на плод (cm)	Маса на цел плод (g)	Маса на плод без дршка (g)	Дебелина на перикарп (cm)	Број на комори	Маса на суво семе (g)	Број на семки	Суви материи (%)
КК к	9,888	4,711	48,688	40,089	0,390	2,20	0,853	170,600	9,420
КК1	10,123	5,031	60,336	51,530	0,369	2,00	0,927	165,075	8,118
КК2	11,216	5,266	70,890	61,338	1,894	2,00	1,186	166,750	7,860
РК	30,336	6,743	75,902	62,018	0,500	4,40	1,416	258,000	11,440
Р3	14,843	3,554	42,080	34,455	0,264	2,05	0,408	100,300	5,630
Р4	15,638	3,543	43,879	36,193	0,254	2,05	0,427	102,45	5,640
FK	8,389	5,300	63,515	54,583	0,392	3,10	0,599	138,100	4,620
F5	5,985	5,873	69,325	60,787	0,406	3,20	1,155	86,288	4,780
F6	8,444	5,349	71,072	62,475	0,386	2,85	0,422	100,183	5,070
F7	5,718	5,796	61,995	54,333	0,384	3,00	0,324	90,275	4,680

Табела 17. Морфолошки и производствени карактеристики на плодови кај различни генотипови типови пиперка во ботаничка зрелост одгледувани во оранжерија во 2007 (изразени во средни вредности)

Шифра на генотип	Должина на плод (cm)	Ширина на плод (cm)	Маса на цел плод (g)	Маса на плод без дршка (g)	Дебелина на перикарп (cm)	Број на комори	Маса на суво семе (g)	Број на семки	Суви материи (%)
КК к	10,656	4,965	58,385	48,915	0,326	2,00	1,429	216,40	8,56
КК1	10,912	5,461	73,340	62,519	0,379	2,00	1,321	208,05	8,62
КК2	11,371	5,592	79,678	67,670	0,354	2,05	1,607	198,25	7,92
РК	13,544	3,374	32,169	26,322	0,210	2,10	0,774	138,40	8,98
Р3	14,405	3,402	43,400	35,947	0,224	2,00	1,347	124,20	9,37
Р4	14,696	3,822	47,999	39,220	0,221	2,05	1,144	126,45	9,31
FK	8,457	6,289	101,822	90,772	0,565	3,40	0,978	173,80	7,00
F5	6,021	6,611	79,456	69,510	0,478	3,05	0,858	142,55	7,87
F6	9,541	5,337	68,936	62,362	0,427	2,80	0,585	102,35	8,16
F7	5,805	6,051	67,832	59,625	0,465	3,050	0,650	116,62	8,23

Табела 18. Морфолошки и производствени карактеристики на плодови кај различни генотипови типови пиперка во технолошка зрелост одгледувани во пластеник во 2007 (изразени во средни вредности)

Шифра на генотип	Должина на плод (cm)	Ширина на плод (cm)	Маса на цел плод (g)	Маса на плод без дршка (g)	Дебелина на перикарп (cm)	Број на комори	Маса на суво семе (g)	Број на семки	Суви материи (%)
КК к	13,239	4,522	63,395	55,955	0,345	2,5	0,714	103,4	10,10
КК1	12,817	5,164	79,344	69,010	0,374	2,0	0,482	68,1	10,04
КК2	12,261	4,202	63,468	57,580	0,394	2,0	0,166	28,6	7,20
КК3	13,128	4,778	77,298	68,826	0,306	2,5	0,394	73,125	7,95
РК	12,958	4,432	63,13	56,574	0,399	2,6	0,465	102,6	7,58
Р3	15,504	3,018	44,548	38,761	0,240	2,5	0,332	65,1	6,66
Р4	15,887	3,105	46,410	40,299	0,298	2,4	0,327	72,5	6,80
ZMK	14,329	4,591	67,444	57,264	0,377	2,6	0,693	104,9	7,68
ZM1	12,867	4,449	54,986	50,156	0,376	2,4	0,232	70,9	7,54
ZM2	14,097	2,855	37,068	31,910	0,238	2,7	0,18	39,4	6,68
FK	7,787	5,602	66,158	51,834	0,456	4,0	0,202	161,8	5,12
F5	5,851	7,106	93,848	83,682	0,505	3,4	0,347	103,6	5,96
F6	9,961	6,175	92,774	83,517	0,410	3,5	0,283	116	5,76
F7	6,49	7,255	120,103	103,94	0,557	3,33	0,89	204,3	5,87
F8/I	7,936	5,689	73,463	65,324	0,395	3,70	0,117	79,3	5,82
F8/II	10,228	6,100	110,535	95,830	0,420	4,0	0,755	272	6,30

Табела 19. Морфолошки и производствени карактеристики на плодови кај различни генотипови типови пиперка во ботаничка зрелост одгледувани во пластеник во 2007 (изразени во средни вредности)

Шифра на генотип	Должина на плод (cm)	Ширина на плод (cm)	Маса на цел плод (g)	Маса на плод без дршка (g)	Дебелина на перикарп (cm)	Број на комори	Маса на суво семе (g)	Број на семки	Суви материи (%)
КК к	11,502	4,78	60,01	53,734	0,347	2,5	0,488	66,5	10,48
КК1	11,544	4,769	67,726	60,301	0,352	2,5	0,394	54,25	10,125
КК2	12,649	5,125	86,945	76,813	0,378	2,225	0,66	65,75	9,55
КК3	12,773	4,414	60,228	52,161	0,338	2,2	0,781	103,4	9,96
РК	10,974	3,55	48,225	38,659	0,224	2,5	0,524	71,9	8,62
Р3	16,995	3,65	57,399	47,708	0,236	2,6	0,976	103,5	8,48
Р4	12,932	4,353	62,264	52,398	0,347	2,2	0,662	82,9	9,96
ZMK	13,436	4,301	62,04	53,679	0,322	2,2	0,316	67,8	9,62
ZM1	10,739	3,176	61,216	28,659	0,26	3,2	0,215	27,0	8,48
ZM2	6,459	6,354	84,393	76,771	0,505	3,2	0,311	59,8	9,5
FK	9,986	5,994	94,242	85,224	0,394	2,7	0,471	91,1	9,2
F5	6,980	7,360	123,84	116,65	0,5	4,0	0,23	26	8,6
F6	4,761	4,906	35,916	33,8	0,347	3,7	0	0	9,948
F7	11,502	4,78	60,01	53,734	0,347	2,5	0,488	66,5	10,48
F8/I	11,544	4,769	67,726	60,301	0,352	2,5	0,394	54,25	10,125
F8/II	12,649	5,125	86,945	76,813	0,378	2,225	0,66	65,75	9,55

Табела 20. Морфолошки и производствени карактеристики на плодови кај различни генотипови пиперка во технолошка зрелост одгледувани во пластеник во 2008 (изразени во средни вредности)

Шифра на генотип	Должина на плод (cm)	Ширина на плод (cm)	Маса на цел плод (g)	Маса на плод без дршка (g)	Дебелина на перикарп (cm)	Број на комори	Маса на суво семе (g)	Број на семки	Суви материји %
KK1/1	13,31	6,63	129,7	106,5	0,430	2,4	1,85	248,6	8,0
KK1/8	14,66	6,07	124,5	107,5	0,490	2,4	1,11	138,4	8,1
KK3/2	15,16	5,84	127,3	108,6	0,420	3,0	1,41	160,6	7,7
KK3/4	14,96	5,57	114,1	98,95	0,450	2,6	0,97	102,2	7,4
P3/3	17,28	3,79	57,78	50,96	0,200	2,4	0,56	74,6	5,7
P3/8	19,13	3,44	62,69	53,83	0,250	2,2	0,52	60,0	6,2
P4/1	18,58	3,38	68,33	59,00	0,250	2,0	0,86	104,8	6,8
P4/7	16,45	3,91	72,15	60,08	0,240	2,6	1,03	150,2	5,9
ZM1/2	12,93	5,03	71,89	60,45	0,410	2,4	0,46	69,8	7,3
ZM1/3	11,29	3,75	41,53	33,36	0,460	2,6	0,44	132,2	4,8
ZM2/2*	13,54	2,98	37,13	32,6	0,260	3,0	0,13	23,0	7,0
ZM2/7*	15,96	3,46	42,55	34,45	0,280	2,6	0,74	130,4	6,2
F5/2	7,00	6,94	109,55	88,67	0,400	3,2	1,13	210,4	3,2
F5/9	7,28	7,59	117,92	96,93	0,510	3,4	0,70	114,8	4,3
F6/3	11,12	6,07	112,09	95,72	0,490	3,4	0,55	103,4	4,4
F6/8	9,79	5,97	103,75	75,04	0,450	3,4	0,51	96,7	4,7
KKK	13,96	5,09	74,57	62,13	0,350	2,2	1,14	132,6	6,5
PK	18,82	3,17	49,12	41,65	0,250	2,4	0,54	78,8	3,2
ZMK	14,01	4,75	78,83	66,87	0,400	2,4	0,46	70,2	6,0
FK	8,27	6,52	100,68	83,13	0,530	3,8	0,73	96,4	4,3

Табела 21. Морфолошки и производствени карактеристики на плодови кај различни генотипови пиперка во ботаничка зрелост одгледувани во пластеник во 2008 (изразени во средни вредности)

Шифра на генотип	Должина на плод (cm)	Ширина на плод (cm)	Маса на цел плод (g)	Маса на плод без дршка (g)	Дебелина на перикарп (cm)	Број на комори	Маса на суво семе (g)	Број на семки	Суви материји %
KK1/1	14,49	6,63	167,3	142,9	0,420	2,2	2,19	295,4	7,7
KK1/8	15,15	6,59	190,7	117,6	0,440	2,4	1,81	198,6	7,3
KK3/2	13,87	6,22	129,3	107,8	0,465	3,0	1,67	215,4	7,2
KK3/4	14,33	6,43	135,6	114,95	0,500	2,8	1,87	222,6	7,4
P3/3	17,74	4,77	70,0	55,73	0,420	2,0	1,57	186,8	8,2
P3/8	17,70	4,58	74,7	59,95	0,255	2,0	1,09	158,4	7,2
P4/1	18,25	4,81	58,0	48,42	0,315	2,4	0,53	61,8	9,1
P4/7	20,67	4,39	79,8	62,83	0,260	2,8	1,78	200,4	8,1
ZM1/2	14,61	4,98	135,7	66,92	0,410	2,4	0,79	164,0	7,8
ZM1/3	13,30	5,34	94,5	75,5	0,485	2,8	1,18	190,6	8,8
ZM2/2*	15,43	5,36	57,5	48,2	0,285	2,8	0,58	120,6	9,1
ZM2/7*	14,17	3,95	58,1	46,75	0,275	3,8	0,99	154,8	8,7
F5/2	6,89	7,24	111,0	87,85	0,430	3,0	1,55	239,8	5,4
F5/9	6,59	7,74	129,1	122,5	0,460	3,4	1,41	214,8	6,8
F6/3	10,20	6,82	126,2	104,6	0,490	3,2	0,71	114,0	6,2
F6/8	10,55	6,77	134,9	109,9	0,500	3,6	1,01	197,2	7,3
KKK	13,55	6,50	89,7	77,55	0,385	2,0	1,49	258,8	7,3
PK	16,10	3,58	46,7	38,6	0,280	3,0	0,3	80,8	8,8
ZMK	13,47	4,99	88,0	70,3	0,310	2,2	0,8	131,8	6,6
FK	8,12	7,18	123,5	98,23	0,400	3,8	1,35	222,4	6,4

Табела 22. Морфолошки и производствени карактеристики на плодови кај различни генотипови типови пиперка во технолошка зрелост одгледувани во оранжерија во 2008 (изразени во средни вредности)

Шифра на генотип	Должина на плод (cm)	Ширина на плод (cm)	Маса на цел плод (g)	Маса на плод без дршка (g)	Дебелина на перикарп (cm)	Број на комори	Суви материи (%)
КК к	10,964	4,767	50,415	35,813	0,320	2,00	7,9
КК1	9,650	5,01	57,762	46,736	0,352	2,05	5,6
КК2	9,883	5,315	59,231	48,203	0,321	2,25	6,0
РК	15,302	3,047	31,308	25,592	0,167	2,10	5,35
Р3	14,823	3,606	43,272	34,545	0,234	2,20	4,23
Р4	14,203	3,572	41,562	33,033	0,238	2,15	4,7
FK	7,529	6,539	94,087	78,131	0,534	3,50	4,1
F5	5,049	6,825	88,621	74,723	0,510	3,15	4,0
F6	9,661	5,758	81,98	70,409	0,444	3,00	4,2
F7	6,361	7,091	88,774	69,301	0,513	3,40	3,8

Табела 23. Морфолошки и производствени карактеристики на плодови кај различни генотипови типови пиперка во ботаничка зрелост одгледувани во оранжерија во 2008 (изразени во средни вредности)

Шифра на генотип	Должина на плод (cm)	Ширина на плод (cm)	Маса на цел плод (g)	Маса на плод без дршка (g)	Дебелина на перикарп (cm)	Број на комори	Суви материи (%)
КК к	10,26	5,134	58,495	42,115	0,315	2,1	6,75
КК1	9,822	5,354	57,956	50,652	0,349	2,15	7,6
КК2	10,444	5,294	66,978	54,154	0,313	2,05	6,1
РК	13,306	3,491	35,765	26,072	0,173	2,3	8,05
Р3	12,971	3,510	39,589	29,993	0,237	2,55	7,95
Р4	13,828	3,628	43,838	33,521	0,287	2,2	7,0
FK	6,986	6,816	102,715	88,551	0,445	3,7	5,65
F5	6,944	6,732	96,520	82,852	0,410	3,65	5,9
F6	9,525	6,098	104,769	89,866	0,425	3,4	5,95
F7	6,545	6,315	86,719	73,333	0,458	3,5	6,25

## 5.3 АКЛУЧОЦИ

### 5.1. На македонски јазик:

Како заклучок, во првата експериментална година од проектот различни генотипови на пиперка и различни медиуми беа користени за индукција на андрогенеза на пиперка. Стрес третманот на антерите на Ср медиум и нивниот трансфер на R<sub>1</sub> медиум продуцираа 30 андрогенетски дихаплоидни растенија од различни генотипови користени во експериментот. Од друга страна, сите други медиуми и индуктивни стрес третмани користени за индукција на андрогенеза не резултираа со андрогенетски одговор и формирање на ембриоиди, туку со калусогенеза. Од тука произлегува многу важен заклучок дека во случајот на андрогенеза на пиперка единствен ефективен метод кој дава ембриогенетски одговор е методот на Dumas de Valux et al. (1981).

Растенијата добиени во *in vitro* услови преку процесот на андрогенезата се објект на понатамошно набљудување и колекционирање на семе.

Од семенскиот материјал од 4 сорти на пиперка и тоа: Куртовска капија, Златен медал, Пиран и Фехерозон започнат е процесот на селекција на андрогенетските линии, кои се хомозиготни дупли хаплоиди. Процесот на селекција на овие линии на пиперка паралелно и компаративно се прати и во оранжериски услови и во пластеник.

Понатамошното набљудување на растенијата ќе се движи во насока на опис на нивните карактеристики, способноста да даваат плодови со фертилно семе како и заштита во фазата на цветење и плодоносење со агрилно платно за да се спречи вкстување помеѓу различните селектирани линии на пиперка.

Колекционирањето на семе од спонтани дихаплоидни растенија отвара можност за следење на карактеристиките на хомозиготни линии на пиперка, проучување на сличностите и разликите помеѓу новите хомозиготни линии и стандардните генотипови од кои тие потекнуваат.

Од друга страна, хомозиготноста на пиперките добиени со андрогенеза дава можност за нивно вклучување во процесот на селекција каде би се користеле како наследен материјал од кои би се одбирале потребните и пожелните карактеристики. Со тоа овие пожелни карактеристики би се пренесувале на новата сорта во поглед на принос, квалитет на плодови, отпорност на болести и штетници и други поволни својства.

Процесот на карактеризација и евалуација на добиените андрогенетски линии во текот на 2007 и 2008 година, испитуван во заштитени простори и тоа посебно во оранжериски и во пластенишки услови (Слика 3 и 4), дава неограничени можност за понатамошни истражувања. Поставена е солидна основа за понатамошни истражувања на молекуларно ниво, за да се испита вистинската хомозиготност на добиениот материјал. Постои и можност за утврдување на разликите од начинот на одгледување во оранжерија и во пластеник, каде во пластеник во фазата на цветне и

полинизација на пиперката растенијата од иста линија беа заштитувани со агрилно платно за да се спречи страноопрашувањето на различните линии на пиперка.

Добиениот семенски материјал кој е соодветно складиран во коморите на Ген-Банката во Земјоделскиот факултет при Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип е основа за следење на разликите и сличностите на новите хомозиготни линии добиени од оранжерија и пластеник со стандардните контролни генотипови.

## 5.2. На англиски јазик:

As a conclusion, in a first project experimental year different genotypes of pepper and mediums were used for induction of androgenesis in pepper. With the stress treatment of anthers on Cp medium, and their transfer into R<sub>1</sub> medium, produced 30 androgenetic and dihaploid plant from different genotypes used in the experiment. From the other side, all others used mediums and stress treatment did not result with androgenetic response and embryo formation, but response with callusogenesis. Therefore we could conclude that the only effective method who could result with embriogenetic response is the method of Dumas de Valux et al. (1981).

The plants obtained in *in vitro* conditions through the precess of androgenesis are the object of further examinations and collections of seed material.

From collected seeds from 4 different genotypes of pepper: Kurtovska kapija, Zlaten medal, Piran and Feherozon. From these 4 different genotypes of pepper, which are homozygote and double haploids, the process of selection of androgenetic lines of pepper was started. The process of selection of these pepper lines is observed parallel in the greenhouse and in the plastic tunnel too.

The next observation of plants will be focused on description of plant characteristics, ability for fruit production with fertile seed and protection in the phase of flowering and fertilizing.

Seed collection from spontaneous dihaploids plant opens the possibility for tracking the characteristics of homozygote lines of pepper and research work of similarities and differences between the new homozygote lines with the standard genotypes from whom they are derived.

From the other side, the homozygote of pepper obtained with androgenesis gives opportunities for it's including in the process of selection of pepper, where the needed and useful characteristics would be used for selection. These useful characteristics such as yield, fruit quality, resistance of diseases and pests and other useful characteristics would be allocated to the new genotypes of pepper.

The process of characterization and evaluation of obtained androgentis lines of pepper during the 2007 and 2008 year, examinee in glasshouse and plastic tunnel, gives unlimited opportunities for further experiment. It was established an expellant base for further examination on molecular level, for estimation of real homozigoty of the new plant material. It is a possibility also for examination of differences from the way of growing of the selected lines (glasshouse and plastic tunnel) where in the tunnels the



plants were covered with the acril cloth, to stop the crosspollination between the different lines of pepper.

The obtained seed material which is properly stored in the Gen Bank in the Faculty of Agriculture in Goce Delcev Univeritu – Stip is base for examination of similarities and differences between the different lines of pepper obtained from glasshouse and tunel compared with standard and control lines of pepper.

## **6.ПУБЛИКАЦИИ КОИ ПРОИЗЛЕГУВААТ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО**

### **а) Оригинални научни трудови објавени во списанија во:**

**земјата:**

**6 научни трудови**

1. Колева-Гудева Лилјана и Трајкова Фиданка (2005): Добивање на семе од пиперка добиена во *in vitro* култура од антери. Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури 2004/2005. Вол. 4/5: 85-93 (излезено од печат 2006).

2. Колева-Гудева, Л. и Спасеноски, М. 2006. Органогенеза на котиледони од пиперка (*Capsicum annuum* L.) во услови *in vitro*. Годишен Зборник на ЈНУ Земјоделски Институт - Скопје. Вол. XXIV/XXV: 81-89.

3. Лилјана Колева-Гудева и Мирко Спасеноски (2005): Соматска ембриогенеза во култура од антери на пиперка. Прв Конгрес за заштита на растенијата,,Заштита на животната средина и безбедност на храна,, Охрид 2811-02.12 2005. Зборник на трудови 269-273 (излезено од печат 2006).

4. Колева-Гудева, Л. (2005): Капсаицин - можен инхибирачки фактор во андрогенезата на пиперката. Годишен зборник на ЈНУ Иститут за јужни земјоделски култури 2004/2005. Вол. 4/5:67-74 (излезено од печат 2006).

5. Velichka Rodeva, Liljana Koleva-Gudeva, Stanislava Grozeva, Fidanka Traikova (2007): Obtaining of haploids in anther culture of pepper *Capsicum annuum* L. and their including in the breeding process. Yearbook of Faculty of Agriculture, Goce Delcev University – Stip Vol: 7-19.

6. Лилјана Колева-Гудева (2007): Вегетативно размножување кај некои растителни видови во услови *in vitro*. Годишен зборник на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев” – Штип Вол 7: 19-27.

**странство:**

**3 научени трудови**

1. Koleva-Gudeva, L., Spasenoski, M., Trajkova, F. 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. Scientia Horticulturae 111, 114-119.

2. Vesna Rafajlovska, Renata Slaveska-Raicki, **Liljana Koleva-Gudeva** and Jana Klopceska (2007): Spice paprika oleoresin extraction under different conditions involving acetone and ethanol. Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.5 (2): 65-69.

3. Koleva-Gudeva, L., Trajkova, F., Dimovska G., Spasenoski, M., (2008): Androgenesis efficiency in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). Acta Horticulture (in press).

**б) Монографски публикации во:**

земјата: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
странство: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**в) трудови презентирани на научни собири во:**

земјата: **3 научни презентации**

1. Rafajlovska, V., Srbinska, M., Koleva-Gudeva, L. and Slavevska-Raicki, R. (2006): Extraction of capsaicin and carotenoides from hot red pepper (*Capsicum annuum* L.). 5<sup>th</sup> ICOSECS, International Conference of the South-Eas European Countries of Chemical Sciences at the European Crossroads, Ohrid 10-14.09.2006, Book of Abstracts, Vol 1: 141-141.

2. Колева-Гудева Лилјана, Трајкова Фиданка, (2007): Генетски ресурси на *Capsicum spp.* во генбанката на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури. III Kongres na Ekoložite na Makedinija, Struga, Makedonija 06-09. 09. 2007.

3. Колева-Гудева Лилјана, Трајкова Фиданка, Спасеноски, М. (2007): Примена на андрогенезата како метод за подобрување на разновидноста земјоделските култури. III Kongres na Ekoložite na Makedinija, Struga, Makedonija 06-09. 09. 2007.

странство: **3 научни презентации**

1. Klopceska, J., Rafajlovska, V., Slaveska-Raicki, R., Koleva-Gudeva, L. (2006): Oleorasin extraction from spice paprika, International Symposium on Organic Chemistry, Sofia, Bulgaria, Dec.9-12, 2006. Book of abstracts 67-67.

2. Koleva-Gudeva Liljana, Trajkova Fidanka, Spasenoski, M., (2007): Effectiveness of androgenesis induced in anther culture of pepper (*C. annuum* L.) XIIIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant 5-7 Sep. Warsaw, Poland. Progress in Research on Capsicum & Eggplant: 385-392.

3. Koleva-Gudeva Liljana, Trajkova Fidanka, Gordana Dimeska, Spasenoski, Mirko (2008): Androgenesis efficiency in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.), IV Balcan Symposium on Vegetable and potatoes, Plovdiv, Bulgaria, Sep. 9-12. Book of Abstracts 48-48. Acta Horticulture (in press).

## 7. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

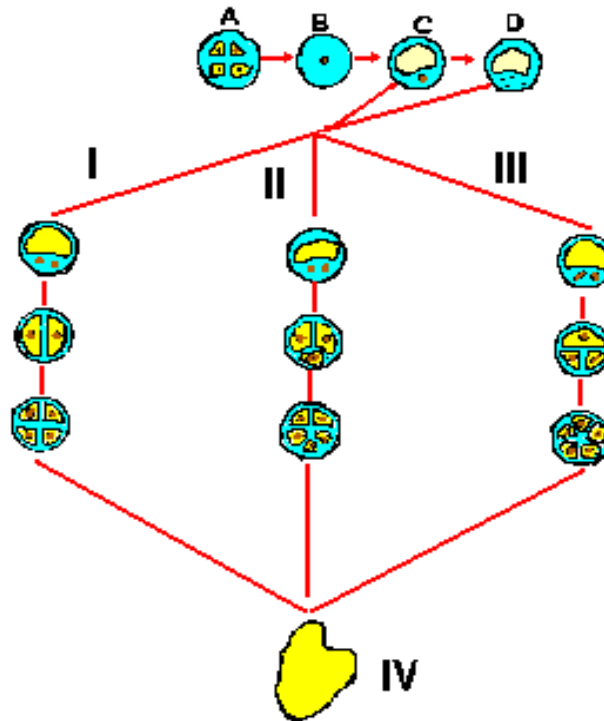
- Aladzajkov, Lj. (1966) General horticulture. Ss. Cyril and Methodius University - Skopje, Faculty of Agriculture, Skopje, R. of Macedonia. (in Macedonian)
- Bárány I., Testillano P.S., Mytikó J., Risueño, MDC (2001) The switch of the microspore developmental program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. *Int. J. Dev. Biol.* 45 (S1): S39-S40.
- Bárány I., González-Melendi P., Fadón B., Mitykó J., Risueño MDC (2005) Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biol. Cell* 97:709-722.
- Binzel, M.L., Sankhla N., Josh, S., Sankhla, D. (1996) Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep.* 15, 536-540.
- Country study for biodiversity of the Republic of Macedonia (2003) First National Report. Ministry of Environment and Physical Planning, July Skopje 2003. [http://www.moe.gov.mk/CHM/STUDY\\_RM.pdf](http://www.moe.gov.mk/CHM/STUDY_RM.pdf) Cited 20 Jan 2008
- Daskalov, H., Popov, P., (1941) Osnovny na zelentchukoizvodstvo v Bulgaria, Sofia. (in Bulgarian)
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, C., Huerta, A., (1997) Androgenesis in *Capsicum annuum* L. – Effects of Carbohydrate and Carbon Dioxide Enrichments. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122 (4):468-475.
- Dumas de Vault, R. (1999) Haploidy and pepper breeding: a review. Invited paper. *Capsicum Newsletter* 8-9: 13-17.
- Dumas de Vault, R., Chambonnet D., Pochard, E. (1981) *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) Anthers: high rate plant production from different genotypes by + 35°C treatments. *Agronomie* 1(10):859-864.
- George, L., Narayanaswamy, S. (1973) Haploid capsicum through experimental androgenesis. *Protoplasma* 78:467-470.
- Irikova, T., Rodeva, V. (2004) Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): the effects of nutrient media. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 23:101-104.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D., Lee, K. (2004) Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum Annuum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77:63-72.

- Kintzos, S., Drossopoulos, J.B., Shortsianitis, E., Peppes, D. (2000) Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. *Scientia Horticulturae* 85:137-144.
- Kaparakis, G. (1999) *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). PhD Thesis, School of Biological Sciences, University of Nottingham, UK, July 1999.
- Koleva-Gudeva Liljana, Trajkova Fidanka, Gordana Dimeska, Spasenoski, Mirko (2008): Androgenesis efficiency in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.), IV Balcan Symposium on Vegetable and potatoes, Plovdiv, Bulgaria, Sep. 9-12. Book of Abstracts 48-48. *Acta Horticulture* (in press).
- Koleva-Gudeva, L., Spasenoski, M., Trajkova, F. (2007) Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horticulturae* 111:114-119.
- Koleva-Gudeva Liljana, Trajkova Fidanka, Spasenoski, M., (2007) Effectiveness of androgenesis induced in anther culture of pepper (*C. annuum* L.) XIIIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant 5-7 Sep. Warsaw, Poland. *Progress in Research on Capsicum & Eggplant*: 385-392.
- Колева-Гудева Лилјана, Трајкова Фиданка, (2007) Генетски ресурси на *Capsicum spp.* во генбанката на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури. III Kongres na Ekolozite na Makedinija, Struga, Makedonija 06-09. 09. 2007.
- Колева-Гудева Лилјана, Трајкова Фиданка, Спасеноски, М. (2007) Примена на андрогенезата како метод за подобрување на разновидноста земјоделските култури. III Kongres na Ekolozite na Makedinija, Struga, Makedonija 2007.
- Колева-Гудева Лилјана (2004) Андрогенеза и органогенеза на пиперка (*Capsicum annuum* L.). Докторска дисертација Лилјана Колева-Гудева, Природно-математички факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј” - Скопје.
- Колева-Гудева Лилјана (2003) Влијание на инкубацискиот третман врз андрогенезата на пиперка (*Capsicum annuum* L.). Годишен зборник на Институт за јужни земјоделски култури – Струмица. Вол 3: 95-102.
- Колева-Гудева Лилјана (2003) Култура на антери од пиперка (*Capsicum annuum* L.). Годишен зборник на Институт за јужни земјоделски култури – Струмица. Вол 3: 87-94.
- Konstantinov, G.H., Belcheva, R.G., Goranov, A., Ralcev. K.H., Genova, K.G., (1985) *Rykovodstvo za prakticheski zanaytiy po genetika*, Sofia.

- Kuo, J.S., Wang, Z.Z., Chien, N.F. (1973) Investigation of the anther culture *in vitro* of *Nicotiana* and *Capsicum annuum* L. Acta Bot. Sin. 15 (1):43–47.
- Lanteri, S., Pickersgill. (1993) Chromosomal structural changes in *Capsicum annuum* L. and *C. chinense* Jacq.. Euphatica 67 (1-2): 155-160.
- Ltifi, A., Wenzel, G. (1994) Anther culture of hot and sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) influence of genotype and plant growth temperature. Capsicum and Eggplant Newsletter 13: 71-74.
- Mitrev, S., Spasov, D. (2002) The health condition of pepper plants in 2001 in South-East Region of Rep. of Macedonia. Yearbook for Plant Protection, Vol. XIII: 79-86.
- Mitrev, S. (2001) Phytopathogenic Bacteria on Pepper in Macedonia. Institute of Southern Crops - Strumica, Strumica, 2001.
- Mitykó, J., Gémes, Junhász, A. (2006) Improvement in the haploid technique routinely used for breeding sweet and spice peppers in Hungary. Acta Agronomica Hungarica. Vol 54 (2): 203-219.
- Mitykó, J., Szabó, L., Barnabás, B. (1999) Colchicine induced ultrastructural changes in barley and pepper microspores. J. Slovak Acad. Sci. 54:24-25.
- Mitykó, J., Fári, M. (1997) Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture. Hort. Biotech. In Vitro Cult and Breeding, ISHS 1997, Acta Hort. 447:281-287.
- Mitykó, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G., Fári, M. (1995) Anther culture response in different genotypes and F<sub>1</sub> hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Breeding 114:78-80.
- Munyon, I.P., Hubstenberger, J.F., Phillips, G. (1989) Oring of plantlets and callus obtained from chili pepper anther cultures. In Vitro Cell. Dev. Biol. 25P: 293-296.
- Nowaczyk, P., Kisiala, A. (2006) Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. J Appl Genet 47(2): 113-117.
- Ökum Çiner, D., Tripirdamaz, R. (2002) The effects of cold treatment and charcoal on in vitro androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). Turk J Bot 26: 131-139.
- Qin, X., Rotino, G.L., (1993) Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. Capsicum and Eggplant Nwsl. 12: 59-62.
- Rafajlovska, V., Srbinska, M., Koleva-Gudeva, L. and Slavevska-Raicki, R. (2006) Extraction of capsaicin and carotenoides from hot red pepper (*Capsicum annuum* L.). 5<sup>th</sup> ICOSECS, International Conference of the South-Eas European Countries

- of Chemical Sciences at the European Crossroads, Ohrid 10-14.09.2006, Book of Abstracts, Vol 1: 141-141.
- Rodeva, V., Koleva-Gudeva, L., Grozeva, S., Traikova, F. (2007): Obtaining of haploids in anther culture of pepper *Capsicum annuum* L. and their including in the breeding process. Yearbook of Faculty of Agriculture, Goce Delcev University – Stip Vol: 7-19.
- Rodeva, V.N., Irikova, T.P., Todorova, V.J. (2004) Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): Comparative study of effects of the genotype. Biotechnol. & Botechnol. Eq. 18/3:34-38.
- Rusevski, R., Bandzo, S. (2004). Improvement of health condition, productivity and quality of pepper and tomato in the region of Pelagonia. Support of modernization of Macedonian agriculture, Deutsche Gesekkschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Skopje. (in Macedonian)
- Sangwan, R.S., Sangwan-Norreel, B.S. (1990) Anther and Pollen Culture. In: Bhojwani SS (ed) Plant Tissue Culture: Application and Limitation. Development in Crop Science, vol. 19. Elsevier, Amsterdam, pp. 220-241.
- State office for statistics, Republic of Macedonia (2005) Publication for agriculture 2005. [http://www.stat.gov.mk/english/glavna\\_eng.asp](http://www.stat.gov.mk/english/glavna_eng.asp) Cited 15 Jan 2008
- Stoymenova, E., Mitrev, S., Bogatzevska, N. (2005): New sources of tobamoviruses, CMV and bacterial spot resistance in pepper. Proceeding of Articles. I<sup>st</sup> Congress of Plant Protection “Environmental Concern and Food Safety”, 29.11.-02.12.2005, Ohrid: 105-108.
- Seguí-Simarro, J.M., Bárány, I., Suárez, R., Fadón, B., Testillano, P.S., Risueño R. (2006) Nuclear bodies domain changes with microspore reprogramming to embryogenesis. European Journal of Histochemistry, Vol. 50 (1): 35-44.
- Tjio, J.H., Levan, A. (1950) The use of oxuquinoline in chromosomes analysis. Anal. Extac. Exp. Aula Dei 2 1:21-64
- Supena, E.D.J., Suharsono, S., Jakobsen, E., Custer, J.B.M. (2006) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubling haploid production in indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep. 25:1-10.
- Vesna Rafajlovska, Renata Slaveska-Raicki, Liljana Koleva-Gudeva and Jana Klopceska (2007): Spice paprika oleoresin extraction under different conditions involving acetone and ethanol. Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.5 (2): 65-69.

## 8. ПРИЛОГ автентични фотографии од истражувањето



Слика 1. Шематска илустрација на *in vitro* формирање на хаплоидни ембриониди од изолирани микроспори.

А: Тетради со четири микроспори (развиени после првата или втората редукциона делба).

В: Изолирана микроспора непосредно пред првата поленова митоза.

С: Вакуолизација резултат на движење на јадрото кон клеточниот сид.

Д: Прва поленова митоза.

I: Прва поленова митоза која резултира со формирање на 2 симетрични јадра кои и двете се делат.

II: Прва поленова митоза, која резултира со формирање на 2 асиметрични јадра (едно вегетативно, едно генеративно) од кој само вегетативното понатаму продолжува да се дели додека генеративното се абортира).

III: Формирање на 2 асиметрични јадра, од кој само генеративното понатаму продолжува да се дели додека вегетативното се абортира.

IV: Формирање на хаплоиден ембрионид.



Слика 2. Разни фази од развојот на цветовите на пиперката.



Слика 3. Одгледување на пиперка „мајки,, донатори на антери во оранжерија



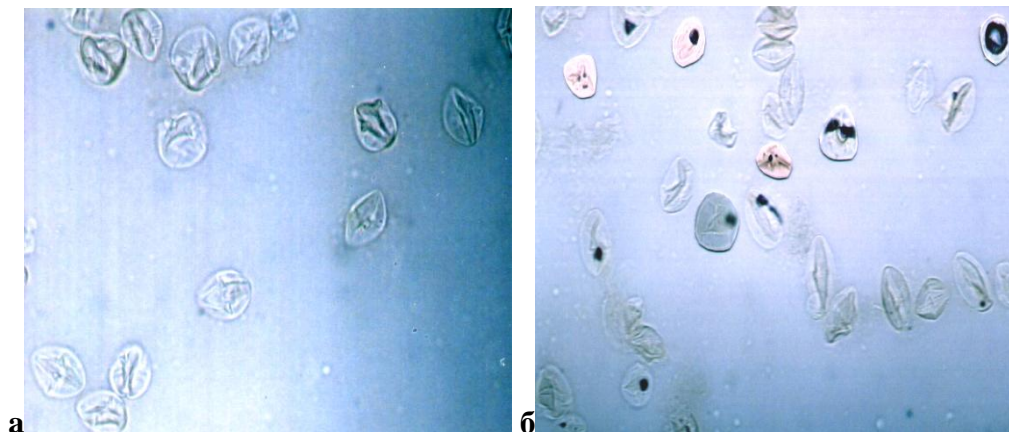
а



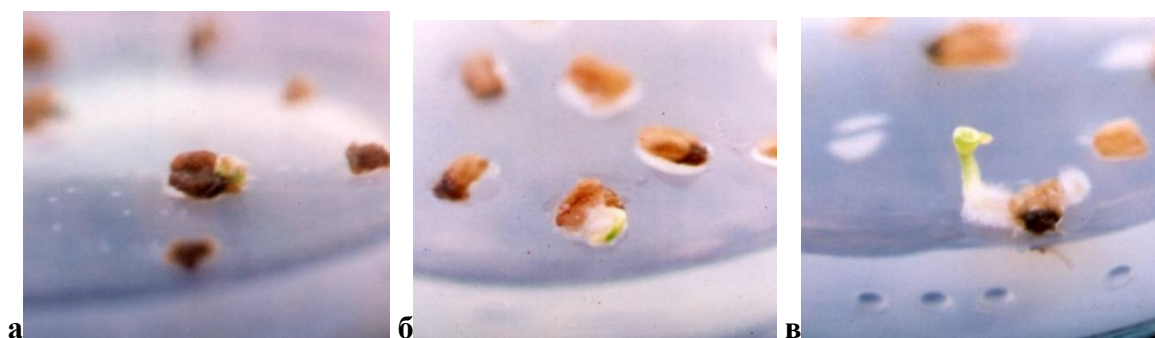
б

Слика 4. Изолирани антери од пиперка: а) обоени со ацето-кармин  
б) поставени на индукционен CP медиум Dumas de Valux et al 1981.

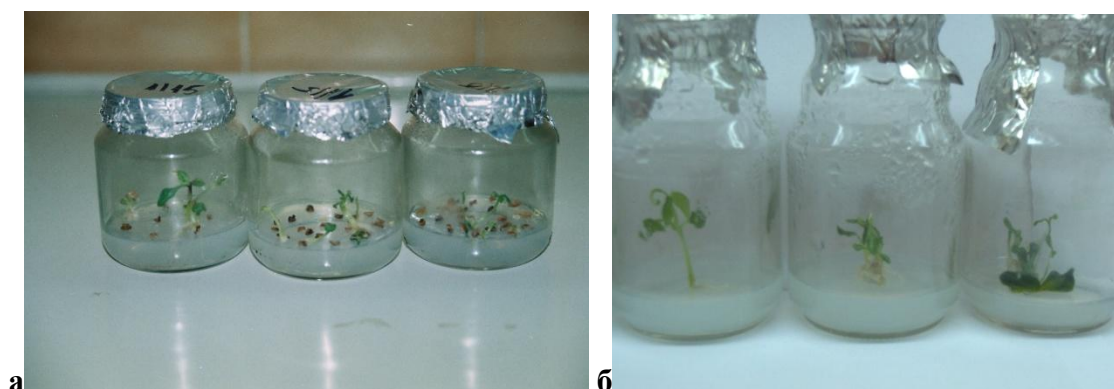




Слика 5. Делба на микроспори: а) во *in vivo* услови; б) во *in vitro* услови



Слика 6 а, б, в): Појава и развој на соматски ембриоид на површината од антера на пиперка во култура на антери во *in vitro* услови



Слика 7. Регегеранти од култура на антери од пиперка: а) на индуктивен СР медиум; б) субкултивирани на V<sub>3</sub> медиум за вкоренување



Слика 8. Постапување на културите во клима комора на



Слика 9. Развој на регенерантите во клима комора на контролирани услови:  
а) по расадување; б) во фаза цветање



Слика 10. Адаптација и аклиматизација на регенерантите од стерилни услови (лабораторија) во нестерилни услови (оранжерија)





Слика 11. Поставување на експериментот во оранжериски услови:  
а) во фаза на цветање; б) во фаза на плодоносење



Слика 12. Поставување на експериментот во пластенички услови:  
а) во фаза на расадување; б) во фаза на цветање и плодоносење



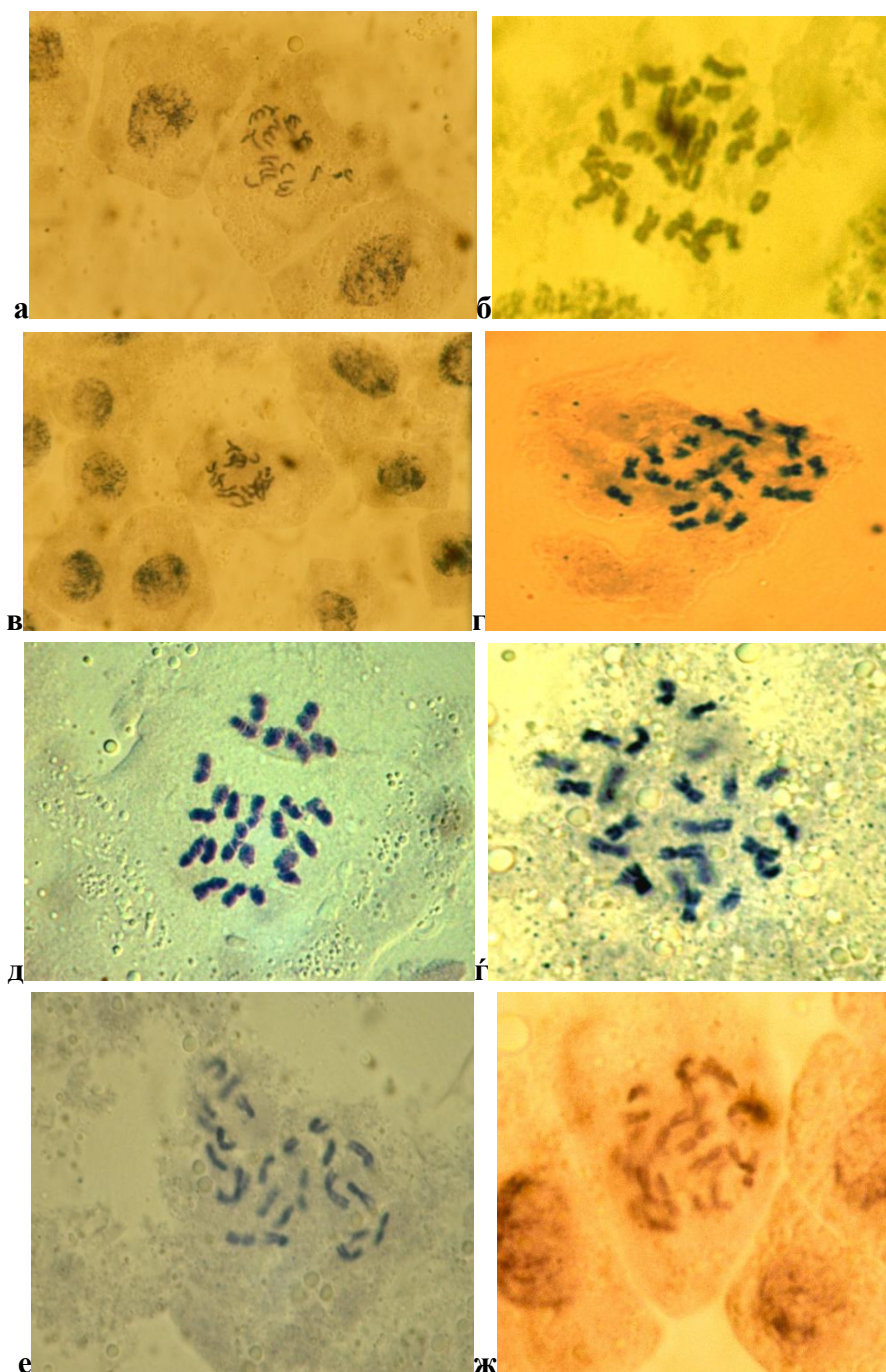
Слика 13. Производство на расад од андрогенетските линии на пиперка



Слика 14. Целосно развиени растенија од различни генотипови на пиперка добиени со андрогенеза, а аклиматизирани во оранжериски услови:

а) Златен медал; б) Куртовска капија; в) Пيران; г) FÉHERÖZÖN





Слика 15. Одредување на кариотип на пиперка:

- а) Пиран *in vivo* контрола; б) Пиран *in vitro*
- в) Féherözön *in vivo* контрола; г) Féherözön *in vitro*
- д) Златен медал *in vivo* контрола; ф) Златен медал *in vitro*
- е) Куртовска капија *in vivo* контрола; ж) Куртовска капија *in vitro*